



Universidad Nacional Mayor de San Marcos
Universidad del Perú. Decana de América
Facultad de Medicina Veterinaria
Escuela Académico Profesional de Medicina Veterinaria

Identificación de grupos filogenéticos de *Escherichia coli* aislado de crías de alpacas (*Vicugna pacos*) con diarrea

TESIS

Para optar el Título Profesional de Médico Veterinario

AUTOR

Francisco Josimar SICHA ROMERO

ASESOR

Siever Miguel MORALES CAUTI

Lima, Perú

2016



Reconocimiento - No Comercial - Compartir Igual - Sin restricciones adicionales

<https://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/4.0/>

Usted puede distribuir, remezclar, retocar, y crear a partir del documento original de modo no comercial, siempre y cuando se dé crédito al autor del documento y se licencien las nuevas creaciones bajo las mismas condiciones. No se permite aplicar términos legales o medidas tecnológicas que restrinjan legalmente a otros a hacer cualquier cosa que permita esta licencia.

Referencia bibliográfica

Sicha F. Identificación de grupos filogenéticos de *Escherichia coli* aislado de crías de alpacas (*Vicugna pacos*) con diarrea [Tesis de pregrado]. Lima: Universidad Nacional Mayor de San Marcos, Facultad de Medicina Veterinaria, Escuela Académico Profesional de Medicina Veterinaria; 2016.



ACTA DE SUSTENTACIÓN DE TESIS PARA OPTAR EL TÍTULO PROFESIONAL DE MÉDICO VETERINARIO

En el auditorio principal de la Facultad de Medicina Veterinaria, el día **jueves 28 de abril de 2016**, a las **10:00** horas, se constituyó el Jurado Examinador designado mediante Resolución Directoral N° **057-EAPMV/FMV-2016**, integrado por los siguientes profesores:

ROSA PERALES CAMACHO
SIEVER MORALES CAUTI
LUIS HOYOS SIFUENTES
RONALD JIMÉNEZ ALIAGA

Presidente del Jurado
Asesor de la Tesis
Miembro del Jurado
Miembro del Jurado

Luego de la instalación del Jurado, a cargo del Presidente del Jurado y bajo la dirección del mismo, el Bachiller Don: **SICHA ROMERO, FRANCISCO JOSIMAR**, para optar el Título Profesional de Médico Veterinario, procedió a sustentar públicamente la Tesis:

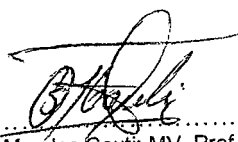
"IDENTIFICACIÓN DE GRUPOS FILOGENÉTICOS DE *Escherichia coli* AISLADO DE CRÍAS DE ALPACAS (*Vicugna pacos*) CON DIARREA"


Luego de absolver las preguntas del Jurado y del público asistente, el Jurado deliberó con la abstención reglamentaria del Asesor de la Tesis y acordó su **APROBACIÓN** por **UNANIMIDAD**, otorgándole la nota de **DIECISIETE (17)**.

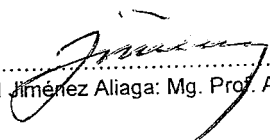
Habiéndose aprobado la sustentación pública de la Tesis, el Presidente en representación del Jurado recomienda que la Escuela Académico Profesional de Medicina Veterinaria proponga la aprobación del **TÍTULO PROFESIONAL DE MÉDICO VETERINARIO** a la Facultad de Medicina Veterinaria y que ésta proponga al Rectorado el otorgamiento respectivo.

Siendo las **10:45 horas**, concluyó el acto académico de sustentación pública de Tesis en fe de lo cual suscriben la presente acta por cuadruplicado los integrantes del Jurado:


Rosa Perales Camacho: MSc. Prof. Principal, D.E.


Siever Morales Cauti: MV. Prof. Asociado, T.P.


Luis Antonio Hoyos Sifuentes: Mg. Prof. Auxiliar, T.C.


Ronald Jiménez Aliaga: Mg. Prof. Asociado, D.E.





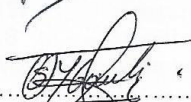
UNIVERSIDAD NACIONAL MAYOR DE SAN MARCOS
Universidad del Perú, DECANA DE AMÉRICA
Facultad de Medicina Veterinaria
ESCUELA ACADÉMICO-PROFESIONAL DE MEDICINA VETERINARIA

Trabajo sustentado y aprobado ante el Jurado designado por la Escuela Académico Profesional de Medicina Veterinaria mediante Resolución Directoral N° 057-EAPMV/FMV-2016.

PRESIDENTE :


ROSA PERALES CAMACHO

MIEMBROS :


SIEVER MORALES CAUTI
Asesor de la Tesis

.....
LUIS HOYOS SIFUENTES


RONALD JIMÉNEZ ALIAGA

San Borja, 28 de abril de 2016

V° B°

.....
MV. Mg. HERMELINDA RIVERA GERONIMO
Directora de la Escuela Académico Profesional de
Medicina Veterinaria



*Este trabajo de investigación
esta dedicado con todo mi amor
y afecto a mis padres y a mi
hermana. Mi Familia, mi
principal soporte y el motivo
más grande que tengo para
seguir creciendo como persona
y profesional.*

AGRADECIMIENTOS

A Facultad de Medicina Veterinaria de la UNMSM por ser mi alma mater. Me siento muy orgulloso de ser parte de ella.

A mis profesores de la Facultad de Medicina Veterinaria de la UNMSM por brindarme una formación profesional y por enseñarme a amar más esta noble profesión.

Al Dr. Siever Morales Cauti por la dirección y apoyo que me ha brindado durante la realización mi tesis, por todas las experiencias y buenos momentos de trabajo.

A los señores del Concytec y al Dr. Eslava, de la Universidad Atónoma de México, por apoyarme en el desarrollo del presente trabajo de investigación.

A María del Pilar, por todos los momentos de estudio, amanecidas, trabajo, compañerismo, amistad, complicidad, afecto, consejos , paciencia, comprensión y, por sobre todo, mucho amor.

A Julio César Mauricio por su buena amistad, por muchas experiencias compartidas en el estudio y otras actividades no académicas.

A Carmen Arias, Julio Lavalle y Rosalyn Hurtado, por su amistad y por ser parte de muchos recuerdos que guardo y siempre tendre presente en mi mente.

A Norelli Solano y Eduardo Salazar, por compartir gratos recuerdos en los viajes realizados en el último año académico y por brindarme su amistad.

A Jorge De la Garza por ser un excelente guía durante mi estancia en México y por toda la ayuda recibida de su parte para la realización de la presente tesis.

INDICE

RESUMEN	v
ABSTRACT	vi
LISTA DE CUADROS Y FOTO	vii
ABREVIATURAS	viii
I. INTRODUCCIÓN	1
II. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA	3
2.1 GENERALIDADES	3
2.2. CARACTERÍSTICAS BIOLÓGICAS	5
2.3. GENETICA BACTERIANA.....	6
2.4. MECANISMOS GENÉTICOS DE LA EVOLUCIÓN DE LA VIRULENCIA ..	10
2.5. PATOTIPOS.....	11
2.6. GRUPOS FILOGENÉTICOS.....	13
2.7. CARACTERIZACIÓN.....	16
2.7.1. TIPIFICACIÓN.....	16
2.7.2. REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA (PCR)	18
2.8. COLIBACILOSIS EN ALPACAS	20
2.8.1. EPIDEMIOLOGÍA	20
2.8.2. MANIFESTACIONES CLÍNICAS	21
2.8.3. HALLAZGOS DE NECROPSIA	22
2.8.4. DIAGNOSTICO.....	22
2.8.5. DIAGNOSTICO DIFERENCIAL	23
2.8.6. PREVENCIÓN Y CONTROL.....	24
2.8.7. IMPORTANCIA EN SALUD PÚBLICA	25
III. MATERIALES Y MÉTODOS.....	28
3.1. LUGAR DE ESTUDIO.....	28
3.2. RECOLECCIÓN DE MUESTRAS.....	28
3.3. CULTIVO Y AISLAMIENTO BACTERIANO	28
3.4. EXTRACCIÓN DE ADN	29
3.5. AMPLIFICACIÓN DE ADN	29
IV. RESULTADOS	31
V. DISCUSIÓN	33
VI. CONCLUSIONES	37
VII. RECOMENDACIONES.....	38
VIII. BIBLIOGRAFÍA	39

RESUMEN

El objetivo del presente trabajo fue la identificación de grupos filogenéticos de *Escherichia coli* aislados a partir de hisopados rectales de neonatos alpacas (*Vicugna pacos*) con diarrea. El muestreo se realizó con hisopos esteriles y fue transportado en medio Stuard, el aislamiento en agar Mc conkey y la identificación por pruebas bioquímicas convencionales. *E. coli* fue aislada de 119 muestras de un total 150 colectadas. La determinación de los grupos filogenéticos se realizó mediante la utilización del método de PCR triplex descrito por Clermont *et al.* (2000), para clasificar a *E. coli* en 4 grupos filogenéticos A, B1, B2 y D, basándose en 3 marcadores genéticos *chuA*, *yjaA* y TSPE4.C2. Se determinó que los grupos filogenéticos B1 y D fueron hallados con mayor frecuencia con 65.55% y 19.33 %, respectivamente; el grupo filogenético menos frecuente fue el B2 con 1.68%. Cabe resaltar que este es el primer trabajo realizado en el Perú para agrupar cepas patógenas de *E. coli* basado en la agrupación filogenética.

Palabras clave: Grupo filogenético, Alpacas, diarrea, *Escherichia coli*.

ABSTRACT

The aim of this study was the identification of *Escherichia coli* phylogenetic groups from samples collected from young alpacas (*Vicugna pacos*) with diarrhea. Sampling was done in Cerro de Pasco and isolation was performed in the Laboratory of Microbiology IVITA El Mantaro. *E.coli* was isolated from 119 samples of 150 collected. Phylogenetic groups determination was made using the Clermont's method which classify *E. coli* in 4 major phylogenetic groups A, B1, B2 and D, based in 3 genetic markers chuA, yjaA and TSPE4.C2. Following a scheme dichotomous key phylogenetic group of the strains under study was determined.(A: chuA -, yjaA ±, TSPE4.C2 -; B1: chuA -, yjaA ±, TSPE4.C2+; B2: chuA+, yjaA+, TSPE4.C2±; D: chuA+, yjaA-, TSPE4.C2±). Through this algorithm was found that 65.55% ± 0.37, 19.33% ± 1.37, 13.45% ± 0.13 and 0.46 ± 1.68% belongs to phylogenetic group B1, D, A and B2 respectively. Therefore, according to the characteristics of each group, it was determined that 21% (25/119) of *E. coli* isolates belonging to extraintestinal pathogenic strains (phylogenetic groups B2 and D) and 79% (94/119) are commensal strains.

Key words: Phylogenetic groups, Alpacas,diarrhea, *Escherichia coli*

LISTA DE CUADROS Y FOTO

Cuadro 1. Primers utilizados en la PCR triplex	pag. 30
Cuadro 2. Sistema utilizado por Clermont <i>et al.</i> (2000) para la agrupación filogenética	pag. 30
Cuadro 3. Agrupación de la cepas de acuerdo a la llave dicotómica utilizada en el cuadro 1 (n = 119)	pag.31
Foto 1. Gel de electroforesis de los genes <i>chua</i> , <i>yjaA</i> y <i>TSPE4.C2</i> en las muestras evaluadas por PCR triplex	pag. 32

ABREVIATURAS

Antígeno H:	Antígeno flagelar
Antígeno K:	Antígeno capsular
Antígeno O:	Antígeno somático
DAEC:	<i>E. coli</i> de adherencia difusa
EAEC:	<i>E. coli</i> enteroagregativa
EHEC:	<i>E. coli</i> enterohemorrágica
EIEC:	0020 <i>E. coli</i> enteroinvasiva
EPEC:	<i>E. coli</i> enteropatógena
ETEC:	<i>E. coli</i> enterotoxigénica
ExPEC:	<i>E. coli</i> extraintestinal patógena
MAEC:	<i>E. coli</i> asociada a meningitis
MLEE:	Electroforesis de enzimas multilocus
MLST:	Tipificación de enzimas multilocus
PCR:	Reacción en cadena de la Polimerasa
STEC:	<i>E. coli</i> productora de toxina Shiga
UTI:	Infecciones urinarias
UPEC:	<i>E. coli</i> uropatógena

I. INTRODUCCIÓN

Escherichia coli es un habitante normal de los intestinos de la mayoría de animales, incluyendo los humanos. Algunas cepas de *Escherichia coli* (*E. coli*) pueden causar una gran variedad de enfermedades extra e intestinales, tales como diarrea, infecciones urinarias (UTIs), septicemia y meningitis neonatal (Kaper *et al.*, 2004; Alteri *et al.*, 2012). Por su importancia médica, existen diferentes técnicas para identificar y clasificar a *E. coli* en cepas patógenas y no patógenas como por ejemplo perfil bioquímico, serotipificación, patotipificación, análisis filogenético, electroforesis de enzimas multilocus (multilocus enzyme electrophoresis, MLEE), tipificación multilocus de secuencias (Multilocus sequence typing, MLST) y Reacción en cadena de polimerasa (Polymerase chain reaction, PCR) y sus variantes (Sclander *et al.*, 1986; Maiden *et al.*, 1998; Kaper *et al.*, 2004; O'Sullivan *et al.*, 2007; Gordon *et al.*, 2008).

El análisis filogenético nos muestra que *E. coli* está agrupado en cuatro principales grupos filogenéticos A, B1, B2 y D (Herzer *et al.* 1990; Clermont *et al.* 2000; Wirth *et al.*, 2006) los cuales están relacionados con el carácter virulento de las cepas contenidas. El grupo filogenético B2 está relacionado con cepas virulentas extraintestinales, y en menor medida las del grupo D, mientras que la mayoría de cepas del grupo A y B1 son comensales (Bingen *et al.*, 1998; Johnson y Stell, 2000; Gordon y Cowling, 2003; Walk *et al.*, 2007). Clermont *et al.* (2000) desarrollaron un rápido y sencillo método utilizando PCR *triplex* para la agrupación de cepas de *E. coli* en los cuatro grupos filogenéticos ya descritos para la cual utilizó 3

marcadores genéticos chuA, yjaA y TSPE4.C2. Esta prueba nos permite agrupar de manera correcta 80 – 85% de las cepas. Este método ha sido validado por Gordon *et al.* (2008) al compararlo con varios esquemas de MLST las cuales son más sensibles y específicas.

La importancia del método de Clermont radica en su utilidad en la práctica clínica, como consecuencia del vínculo establecido entre el grupo filogenético y la virulencia (Bingen *et al.*, 1998; Johnson y Stell, 2000; Wirth *et al.*, 2006), también sirve como herramienta de detección biotecnológica para el control de cepas potencialmente patógenas cuando son evaluadas para la clonación (Clermont *et al.*, 2000).

El presente trabajo se basa en el primer criterio de importancia; es decir, se aplica el método de Clermont para identificar grupos filogenéticos de las cepas aisladas a partir de heces de alpacas neonatas. Cabe resaltar que no existe evidencia en la literatura en la cual se haya aplicado este método para el mismo propósito en el Perú.

II. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

2.1 GENERALIDADES

E. coli fue identificada por primera vez en el año 1885 por el bacteriólogo alemán Theodor Escherich a partir muestras de heces aisladas de niños con enteritis (Mannig, 2010). Inicialmente fue nombrado como *Bacterium coli comune*, luego el género fue cambiado por el actual (Castellani y Chalmers, 1919). *E. coli* es una de las especies bacterianas más versátiles pudiendo alternar entre su hábitat primario, que es el intestino de vertebrados (el cual lo habita como comensal) y su hábitat secundario, como el agua y alimentos (Clermont *et al.*, 2011); además, la variabilidad genética de *E. coli*, dentro de las especies, conduce a la colonización diferencial de los hospederos (Gordon y Cowling, 2003); considerada uno de los microorganismos modelo más importantes en el laboratorio (Alteri y Mobley, 2012) y ha sido utilizada en diferentes estudios; por ejemplo, como indicador de la calidad sanitaria del agua y alimentos para la identificación de la fuente principal de contaminación fecal (Rangel *et al.*, 2005; Carlos *et al.*, 2010). En cuanto a la forma comensal de *E. coli*, ejemplificado por la cepa MG 1655, es considerada, tradicionalmente, como una bacteria inofensiva que vive en el sistema intestinal de mamíferos y ayuda a su hospedero en la degradación de compuestos de carbono (van Elsas *et al.*, 2011).

E. coli es encontrado en la microbiota intestinal el cual consiste en más de 500 especies donde estas que suman más de 10^{10} a 10^{11} células por gramo de contenido de intestino grueso. A pesar de que las bacterias anaeróbicas obligatorias en el intestino superan a *E. coli* de 100/1 a 10,000/1, *E. coli* es el organismo anaerobio facultativo predominante en el tracto intestinal

(Berg, 1996). Además, actúa como comensal inocuo y también existen cepas o patotipos específicos que tienen el potencial para causar un amplio espectro de enfermedades (Alteri *et al.*, 2012). Tres síndromes clínicos generales en el hombre pueden resultar de la infección con cepas patógenas de *E. coli*: enfermedad entérica diarreica, infección del tracto urinario (UTI) y la sepsis/meningitis. Dentro de la categoría de *E. coli* extraintestinales patógenas (ExPEC) tenemos a *E. coli* asociada a meningitis (MAEC) (Gladstone *et al.*, 1990; Unhanand *et al.*, 1993; Dawson *et al.*, 1999; Klinger *et al.*, 2000; Stevens *et al.*, 2003) y *E. coli* uropatógena (UPEC) (Hacker, 1992; Hacker y Kaper, 2000). Entre los patógenos intestinales hay seis categorías bien descritas: *E. coli* enteropatógena (EPEC), *E. coli* enterohemorrágica (EHEC), *E. coli* enterotoxigénica (ETEC), *E. coli* enteroagregativa (EAEC), *E. coli* enteroinvasiva (EIEC), *E. coli* de adherencia difusa (DAEC) (Kaper *et al.*, 2004) y un nuevo patotipo, *E. coli* adherente invasivo (AIEC) (Croxen *et al.*, 2013). Esta diversidad patógena es el resultado de la adquisición de genes patógenos más probablemente a través de transferencias sucesivas de genes de manera horizontal (Escobar-Paramo *et al.*, 2004).

El método utilizado por Selander *et al.* (1986) basado en la MLEE ha sido aplicado en estudios a gran escala para estimar la diversidad genética y la estructura en las poblaciones naturales de una variedad de especies bacterianas. Este estudio ha establecido marcos genéticos poblacionales básicos para el análisis de la variación de los serotipos y otros caracteres fenotípicos, ha proporcionado gran cantidad de datos para la sistemática y sistemas de marcadores útiles para la epidemiología (Selander *et al.*, 1987). Herzer *et al.* (1990) basado en el método de Selander *et al.* (1986) utilizó 20 enzimas y las relaciones filogenéticas entre cepas fueron inferidas del análisis de matriz de distancia genética por el método neighbor – joining (NJ).

MLEE está basada en la asignación indirecta de alelos en base a la movilidad electroforética de enzimas. Sin embargo, la MLST da una asignación directa de alelos, no es ambigua y distingue más alelos por locus, lo que permite altos niveles de discriminación entre los aislados utilizando la mitad de los loci que normalmente se requiere para MLEE. Maiden *et al.* (1998) propuso el uso alternativo de MLST en reemplazo de MLEE. Una de las primeras aplicaciones de la MLST para el estudio de poblaciones de *E. coli*, resultó en la relación entre una serie de cepas de EPEC y EHEC, incluyendo varios aislados de colecciones DEC

(collection of diarrhoeagenic *E. coli*) junto con otros serotipos productores de toxina Shiga, cepa uropatógena 536 y la cepa de laboratorio K-12 (Reid *et al.*, 2000).

Las técnicas de referencia para la agrupación filogenética: MLEE (Selander *et al.*, 1986; Herzer *et al.*, 1990) o Ribotipificación (Bingen *et al.*, 1994; Desjardins *et al.*, 1995; Bingen *et al.*, 1998), requieren de mucho tiempo, son complejas y necesitan una colección de cepas tipificadas. Por ese motivo se desarrollo un método de aplicación mas rápida, simple y económica, basado en PCRtriplex (Clermont *et al.*, 2000), el cual se basa en el reconocimiento de 3 marcadores genéticos que permiten su agrupación filogenética. Otros estudios han realizado la agrupación en base a un numero mayor de marcadores (Clermont *et al.*, 2013; Julian *et al.*, 2015). Estos grupos resultaltantes de la agrupación filogenética son asociados al carácter patógeno o no de *E. coli* (Bando *et al.*, 2007; Chaudhuri y Henderson, 2012).

2.2. CARACTERÍSTICAS BIOLÓGICAS

E. coli es una bacteria no formadora de esporas y usualmente es movil (80% de cepas). Tienen una medida que va desde 1 – 3 μm x 0.4 – 0.7 μm . La temperatura óptima para su crecimiento en medios de cultivos es de 37° C (18 – 24 h). El tamaño de la colonia es de 1 – 1.5 mm de diámetro y son lisas, circulares, brillantes y traslúcidas (Bhatia y Lal Ichhpujani, 2008). Pertenece al dominio *Bacteria* (Woese *et al.*, 1990), pueden ser inmóviles o moverse por medio de flagelos. Por lo general tienen péptidoglucano en sus paredes celulares (De Erice y Golzález, 2012). El filo *Protobacteria* es el grupo más grande del dominio *Bacteria* (Starr *et al.*, 2009). Todas las bacterias de este grupo son gramnegativas y está constituido por 7 clases (Madigan, 2011; Williams y Kelly, 2013). La clase *Gammaproteobacteria* agrupa aproximadamente 250 géneros, caracterisados por mostrar un amplio rango de aerobiosidad, trofismo (incluyendo quimio y fotoautotrofismo) y adaptación a temperaturas variables (Williams *et al.*, 2010).

Enterobacteriaceae es una gran familia de bacilos cuyo habitat natural es el tracto intestinal de animales y humanos. Incluye muchos géneros y los miembros son anaerobios o aerobios facultativos, fermentan una amplia gama de carbohidratos, poseen una estructura antigénica compleja y producen una variedad de toxinas y otros factores de virulencia (Brooks *et al.*, 2013).

La mayoría de cepas de *E. coli*, fermentan lactosa con rapidez y producen indol. Existen más de 150 antígenos O (somáticos) distintos y un gran número de antígenos K (capsulares) y H (flagelares), los cuales son designados por medio de números. La formula antigénica para los serotipos se describe al unir una letra (O, K o H) con el numero asignado de los antígenos presentes (p. ej., O111:K76:H7) (Ryan y Ray, 2011). También poseen factores de virulencia especializados que se pueden clasificar en dos categorías generales: adhesinas y exotoxinas (Murray *et al.*, 2014). Podemos encontrar en la *Taxonomic outline of the Prokaryotes Bergey's manual of Systematic Bacteriology* en el siguiente link: http://www.bergeys.org/outlines/bergeysoutline_5_2004.pdf.

2.3. GENETICA BACTERIANA

Debido a su posición como modelo preferente en bioquímica, genética, biología molecular y biotecnología; *E. coli* K-12 fue el primer organismo en ser propuesto como candidato a la secuenciación de su genoma, esta posee 46,392,221 pb (4.6 Mb) con 4 289 genes (Blattner *et al.*, 1997). Las distancias en el mapa genómico se dan en minutos y todo el cromosoma se divide en 100 minutos. El cero ha sido fijado arbitrariamente en ThrABC (operón treonina). El tamaño del cromosoma se da por lo tanto en minutos y en pares de bases (Madigan *et al.*, 2011).

El cromosoma se compacta en una estructura conocida como nucleoide. Este revela capas adicionales de organización: los dominios cromosómicos. Estos dominios son mucho mas que dispositivos de compactación simples. Procesos celulares esenciales, tales como la segregación de cromosomas, regulación de genes y la replicación del ADN dependen de la organización de los dominios del cromosoma (Messerschmidt y Waldminghaus, 2014).

Se observó, a través de microscopia electrónica, que el ADN de *E. coli* muestra un patrón de orden en su arquitectura (Deliuss y Worcel, 1974). Esto dio a entender que la estructura cromosómica de *E. coli* está conformada por macro y microdominios (Messerschmidt y Waldminghaus, 2014). Los macrodominios son considerados estructuras de orden superior, los cuales fueron descritos por primera vez en el 2000 (Niki *et al.*, 2000; Espelí y Bocard, 2006). Niki *et al.*, (2000) encontraron localizaciones de similares loci en una región cromosómica grande que rodea a la región oriC. El loci con patrones de localización similares

se utilizó para definir un macrodominio Ori y Ter, respectivamente; siendo confirmados posteriormente por Valens *et al.* (2004). Otros cuatro macrodominios fueron descritos: Left y Right, que flanquean al macrodominio Ter, y dos regiones no estructurales (NLS= no estructurada izquierda, NSR= no estructurada derecha) que flanquean al macrodominio Ori (Niki *et al.*, 2000; Valens, *et al.*, 2004; Espelí *et al.*, 2008). Los microdominios son segmentos que coexisten con otros microdominios dentro de los macrodominios del genoma de la bacteria (Dorman, 2013). El papel funcional de los microdominios es el de facilitar la compactación del cromosoma, que es necesario para ajustar el cromosoma de 1 mm de longitud en una célula de 2 μ m de largo (Messerschmidt y Waldminghaus, 2014). Los microdominios ayudan a simplificar las reacciones enzimáticas relacionadas con la replicación y reparación del ADN (Postow *et al.*, 2004). En caso de roturas del ADN debido a la cercanía de los extremos, como consecuencia del microdominio, la reparación resulta eficiente (Messerschmidt y Waldminghaus, 2014).

Las islas genómicas (GEIs) son regiones cromosómicamente grandes que forman parte del flexible acervo genético de *E. coli* y que son transferidas de manera horizontal. GEIs son segmentos relativamente grandes de ADN que por lo general tienen entre 10 – 200 kb (Juhas *et al.*, 2009), son reconocidas por el contenido de G+C (G: guanina; C: citosina), que lo diferencia del resto del cromosoma (Juhas *et al.*, 2009) y genes de ARNt que están insertados en él (Hacker *et al.*, 1997; Buchrieser *et al.*, 1998). Las GEIs están flanqueadas por 16-20 kb de repeticiones directas (DR), estas suelen surgir por la integración específica de GEIs de su lugar de procedencia hacia su sitio diana, y pueden actuar como secuencias de reconocimiento para su escisión enzimática (Schmidt y Hensel, 2004). Albergan genes que codifican integrasas o factores relacionados a sistemas de conjugación de plásmidos o fagos involucrados en la transferencia de GEIs (Juhas *et al.*, 2009). Presentan elementos de inserción o transposones (Buchrieser *et al.*, 1998; Gal-Mor y Finlay, 2006) y pueden albergar genes que ofrecen una ventaja selectiva de hospedadores. De acuerdo al contenido de los genes, pueden describirse como GEIs de patogenicidad, simbiosis (Sullivan *et al.*, 2002), metabólicas (metabolismo de sacarosa y compuestos aromáticos [Gaillard *et al.*, 2006]), resistencia (resistencia al mercurio, síntesis de sideróforos [Larbig *et al.*, 2002; Dobrindt *et al.*, 2004; Schmidt y Hensel, 2004]).

Las islas de patogenicidad (PAIs) representan un subconjunto de las GEIs y comparten la misma composición y organización general (Hacker y Kaper, 2000; Hacker y Carniel, 2001).

Al igual que las islas de saprobiosis y simbiosis, ellas ejercen su acción en el hospedero. Sin embargo, en este caso las propiedades de fortaleza están directamente relacionadas con los síntomas clínicos causados por *E. coli* patógenas. El concepto de PAIs fue originalmente concebido en la década de 1980 por Hacker *et al.* (1990) y fue estudiado en UPEC (*Escherichia coli* uropatogénica) y EPEC (Hacker *et al.*, 1983; Low *et al.*, 1984; Blum *et al.*, 1994; Mühldorfer y Hacker, 1994; McDaniels *et al.*, 1995; Swenson *et al.*, 1996).

Los factores de virulencia codificados por PAIs se pueden agrupar en familias: transportadores de proteínas por sistemas de secreción de proteínas tipo I, II, III, IV, V; antígenos O; toxinas formadoras de poros; proteínas causantes de apoptosis; superantígenos; secretores de lipasa y proteasas (Schmidt y Hensel, 2004).

Los plásmidos fueron descritos por primera vez en la implicancia de la recombinación genética de *E. coli* (Tatum y Lederberg, 1947). En 1953, fue descrito “el sexo de las bacterias”, en una obra la cual fue una de las primeras en utilizar los términos “episome” y “plásmido”, para describir estructuras extracelulares capaces de reproducirse en un estado independiente (Lederberg y Tatum, 1953).

Los primeros estudios con plásmidos bacterianos se centraron en los que codifican resistencia a los antimicrobianos, conocidos como factores R (Watanabe, 1963). A partir de esos estudios, se encontró que los plásmidos poseen ciertas propiedades que incluyen: replicación autónoma, movilidad, gama de huéspedes y la incompatibilidad con otros plásmidos (Funnell y Phillips, 2004).

Los trabajos relacionados con el factor de fertilidad, o factor F en *E. coli*, amplió aún más nuestra comprensión de la transferencia de plásmidos y su replicación. Por ejemplo, los estudios sobre el factor F permitieron comprender mejor los mecanismos de transferencia de genes entre bacterias donantes y receptoras, y llevaron al descubrimiento de que los plásmidos contienen “replicones” responsables del control de su propia replicación (Jacob y Brenner, 1963).

En la década de 1960, gracias a los estudios de muchos investigadores implicados en los plásmidos R, F y Col (colicin-encoding), los atributos básicos de los plásmidos fueron establecidos. La identificación temprana de una asociación entre los plásmidos y la

transferencia de la resistencia a múltiples fármacos, por parte de varios laboratorios japoneses, aceleró el interés de la genética de los plásmidos y dio lugar a una mejor comprensión de la conjugación bacteriana (Falkow, 1975). En la década de 1970, los pequeños plásmidos de alto número de copias de *E. coli* fueron modificados para su uso como herramientas fundamentales en la tecnología de ADN recombinante. El trabajo de Cohen *et al.* (1973) estableció firmemente a los plásmidos como herramientas para la clonación de ADN.

Un estudio pionero demostró las propiedades patógenas de los plásmidos de *E. coli* que causan diarrea en lechones (Smith y Linggood, 1971). Estudios posteriores demostraron que una clase importante de factores de virulencia codificados por los plásmidos, son genes que confieren resistencia contra agentes antimicrobianos, metales pesados, tóxicos y otros factores de supervivencia contra dosis letales de antimicrobianos (Mayer *et al.*, 1995; Bennet, 2008; Hawkey, 2008).

Los factores de virulencia transmitidos por plásmidos incluyen BFP (bundle-forming pili) de EPEC (Giron *et al.*, 1991; Donnenberg *et al.*, 1992) con genotipo *bfpA*, *espA* y *eae* (Cleary *et al.*, 2004); Ehx (Enterohemolysin) con genotipo *ehxCABD* en EHEC (Schmidt *et al.*, 1995; Burland *et al.*, 1998; Lim *et al.*, 2010); pCoo (plásmido Coo) que codifica el pili CS1 con genotipo *cooB*, *-A*, *-C* y *-D* en ETEC (Froehlich *et al.*, 1994; Froehlich *et al.*, 2005); toxina codificada por plásmidos (Pet) en el plásmido AA de EAEC (Eslava *et al.*, 1998); IcsA (VirG) en EIEC / Shigella (Buchrieser *et al.*, 2000); TraT en UPEC codificada en el plásmido R6-5, R100 o en algunos CoIV (Timmis *et al.*, 1985; Jhonson, 1991), etc.

Los marcadores genéticos utilizados por Clermont *et al.* (2000) para la agrupación filogenética de *E. coli*: *chuA*, *yjaA* y TSPE2.C4, se ubican a 78.7 min (Wyckoff *et al.*, 1998), 90,8 min (Blattner *et al.*, 1997) y 87 min, (Bonacorsi *et al.*, 2000) respectivamente, en relación con el genoma de *E. coli* k-12. El marcador *chuA* se ubica en el macrodominio NSL, y *yjaA* y TSPE4.C2 se ubican en el macrodominio Ori (Reyes-Lamothe *et al.*, 2008; Messerschmidt y Waldminghaus, 2014)

Datos de secuencia del genoma pueden ser correlacionadas con otros estudios para identificar sitios que determinan la función de genes, codificación de factores de virulencia y homología a otros organismos (Bonacorsi *et al.*, 2000; Oshima *et al.*, 2008).

2.4. MECANISMOS GENÉTICOS DE LA EVOLUCIÓN DE LA VIRULENCIA

Los principales eventos genéticos que sustentan la evolución de la virulencia son: la transferencia horizontal (HGT) de genes nuevos y la mutación patoadaptativa de genes existentes. HGT, es un proceso llamado transferencia lateral de genes e implica la transferencia de material genético de una cepa a otra. Regiones genómicas de origen HTG son transportadas por tres elementos génicos mayores: plásmidos, profagos e islas cromosómicas. Como mecanismo alternativo en la evolución de la virulencia, las mutaciones patoadaptativas involucran alteraciones genéticas de los componentes del genoma existentes en lugar de la adquisición de genes nuevos (Donnenberg, 2013).

Los plásmidos son estructuras circulares autoreplicables que coexisten con el cromosoma. Este elemento extracromosomal contiene múltiples factores de virulencia en todas las cepas de *E. coli* diarreogénicas y de *Shigella* spp (Mellmann *et al.*, 2009). Además, genes de plásmidos pueden hasta regular genes de virulencia y resistencia en los cromosomas a través de un extenso dialogo transversal entre el plásmido y el cromosoma, como evidencia de este proceso esta EPEC. Profagos, los fagos temperados tras la inyección de ADN en la bacteria hospedadora no entran inmediatamente en el ciclo lítico sino se integran en el genoma bacteriano como un profago. De hecho, la mayoría de elementos de genes en mosaico en el genoma de *E. coli* son de naturaleza profago (Canchaya *et al.*, 2003). Las islas cromosomales se caracterizan por poseer un diverso grupo de elementos de ADN con una amplia gama de tamaño y abundancia a través de los cromosomas bacterianos (Dobrindt *et al.*, 2004).

Existen tres mecanismos genéticos que hacen que la transferencia de ADN suceda: transducción, conjugación y transformación. Estas formas diversas de transferencia hacen de HTG un proceso muy importante en la expansión del potencial de adaptación genética de una especie bacteriana (Ochman *et al.*, 2000). Transducción es definida como el movimiento de material genético con la ayuda de bacteriófagos, virus que inyectan su ADN dentro de organismos. El fago lítico que usualmente se multiplica inmediatamente y lisa la bacteria infectada, a veces transporta ADN del organismo anteriormente infectado accidentalmente empaquetado dentro de la capsula (Donnenberg, 2013). Conjugación involucra transferencia directa de ADN de un donante a una célula microbiana receptora (Sorensen *et al.*, 2005); *E. coli* y el orden de las bacterias gramnegativas tienen un sistema para la conjugación que involucra la formación de un pili sexual, el cual se diferencia de la conjugación de bacterias grampositivas que involucran el contacto directo célula-célula mediante adhesinas (Grohmann

et al., 2003). Transformación es la captación directa del ADN desnudo, a menudo seguido por recombinación en el ADN genómico de la cepa receptora. Este proceso HGT incorpora grandes segmentos de ADN discretos, como las islas cromosómicas (Chen *et al.*, 2005). Otro mecanismo que es algo similar a la transformación es el de transferencia mediada por vesículas de la membrana externa en *E. coli* (Yaron *et al.*, 2000); sin embargo, a diferencia de la transducción y conjugación, los mecanismos de transformación no están bien entendidos (Donnenberg, 2013).

En cuanto a las mutaciones patoadaptativas los mecanismos principales son la amplificación, inactivación y variación de genes. Se ha propuesto que la amplificación transitoria de regiones genéticas es un fenómeno común en *E. coli* (y en otras bacterias), lo que le permite una rápida adaptación en ambientes y el aumento de la tasa de evolución adaptativa. (Kugelberg *et al.*, 2006). Este proceso consiste en la amplificación de copias de genes que pueden producir el incremento en la producción de determinada proteína y, si esta confiere una ventaja para el patógeno, ser seleccionada durante la infección (Kugelberg *et al.*, 2006). A diferencia de HGT y la amplificación de genes, que son llamadas mecanismos de ganancia de función para la evolución de la virulencia microbiana, la inactivación de genes es otro mecanismo común representado por la pérdida de funciones a través de inactivación de genes o proteínas (Moran y Plague, 2004). Por otro lado, la variación genética se da a través de mutaciones puntuales que no inactivan pero modifican la función de la proteína codificada (Johnson y Stell, 2000; Weissman *et al.*, 2006).

2.5. PATOTIPOS

Las cepas de *E. coli* patógenas han sido divididas en diferentes patotipos sobre la base de las enfermedades que causan, los factores de virulencia que poseen y el hospedero del cual fue aislada. Los tipos de enfermedad causada por *E. coli* son clasificados en intestinales y extraintestinales. Seis patotipos de cepas de *E. coli* son reconocidos, los cuales poseen factores de virulencia asociados a su carácter patógeno (Nataro y Kaper, 1998; Kaper *et al.*, 2004).

EPEC, causa lesiones en el íleon y se define por su capacidad de adhesión y esfacelamiento (A/E), y capacidad de estimular cambios a gran escala en el citoesqueleto de las células epiteliales, lo que resulta en la formación de un pedestal en el que se encuentra la célula

bacteriana (Nataro y Kaper, 1998). El estándar de oro para la identificación de este patotipo es el genotipado y fenotipado (Vieira *et al.*, 2001).

EHEC, está asociada a la colitis hemorrágica (HC) y por lo general causa lesiones A/E similares a EPEC, pero también produce toxina Shiga (Stx; también conocida como verotoxina) que puede causar daño renal resultando en el síndrome urémico renal (HUS) (Yoon y Hodve, 2008). Las cepas que producen Stx. también se conocen como STEC (*E. coli* productora de toxina Shiga) o VTEC (*E. coli* verotoxigenica) (Blanco *et al.*, 2004). La capacidad de STEC de crecer en cultivos, a partir de muestras de heces, es considerada que es el procedimiento diagnóstico mas definitivo y es generalmente combinada con pruebas que detectan STx en extractos fecales o cultivos (Chapman *et al.*, 1991; Zadik *et al.*, 1993).

EPEC, son una causa importante de la diarrea infantil en los países en vías de desarrollo y de la diarrea de los visitantes de estas regiones (diarrea del viajero) (Qadri *et al.*, 2005), están definidas por la capacidad de producir las enterotoxinas termolabil (LT) y termoestable (ST) (Nataro y Kaper, 1998). La identificación en muestras clínicas se basa en la identificación de estos factores de virulencia a partir de aislados fecales utilizando PCR o ELISA (Sack *et al.*, 1980; Thompson *et al.*, 1986; Sjoling *et al.*, 2007).

EAEC, es definida como la *E. coli* que no secreta ST, ni LT de EPEC, la cual manifiesta una característica agregativa o de “ladrillos apilados” cuando se adhieren a la superficie de las células HEp-2. El estándar de oro para la identificación de EAEC es la prueba de adherencia a células HEp-2. (Cobeljić *et al.*, 1996; Dudley *et al.*, 2006).

DAEC, tiene la habilidad de adherirse al enterocito de superficie HEp-2/HeLa, que se define por un patrón difuso de la adherencia con poca agregación (Scaletsky *et al.*, 1984; Nataro *et al.*, 1985; Nataro *et al.*, 1987; Servin, 2005). Técnicas basadas en PCR, como el PCR-multiplex, para definir colonias *E. coli* obtenidas a partir de cultivos ofrecen un diagnóstico práctico, rápido y preciso (Vidal *et al.*, 2005).

EIEC, comparte muchas características con *Shigella*, y exhibe un fenotipo similar, pero provoca síntomas similares a otras *E. coli* diarreogénicas en lugar de la disentería más grave asociada a *Shigella*. Por ejemplo, algunos antígenos O de EIEC son idénticos o muy próximas

a los antígenos O de *Shigella* y esa característica complica la discriminación entre EIEC y *Shigella* en la serotipificación convencional (Cheasty *et al.*, 1983; Li *et al.*, 2009).

AIEC ha sido implicado como uno de los agentes causales de la enfermedad Crohn (DC), que es una enfermedad inflamatoria intestinal que afecta principalmente el intestino delgado y también esta ligada a la colitis ulcerativa (Loftus, 2004; Martinez-Medina *et al.*, 2009; Miquel *et al.*, 2010; Krause *et al.*, 2011). Cepas de *E. coli* son aisladas de pacientes con DC y esto se ha utilizado en el diagnóstico para identificar AIEC (Baumgart *et al.*, 2007; Martinez-Medina *et al.*, 2009). Sin embargo, la identificación de AIEC de un subgrupo de individuos sanos y varios casos de CD negativos a AIEC reflejan la implicación de determinantes genéticos del hospedero; así como, de un diferente cebador microbiano en pacientes CD (Sartor, 2005).

Por otro lado ExPEC han sido asociadas a una serie de condiciones clínicas como UTI causadas por UPEC (Russo y Johnson, 2000; Johnson y Russo, 2002). El diagnóstico se confirma cuando se observa $\geq 10^3$ bacterias / ml en una muestra de orina y no es necesario realizar un cultivo en pacientes con infección urinaria con síntomas típicos y una historia previa (Kodner y Thomas Gupton, 2010). MAEC (Russo y Johnson, 2000; Johnson y Russo, 2002) es un factor importante de mortalidad y morbilidad, con tasas de letalidad de 15 - 40 % y con un 50 % de sobrevivientes con secuelas neurológicas (Gladstone *et al.*, 1990; Unhanand *et al.*, 1993; Dawson *et al.*, 1999; Klinger *et al.*, 2000; Stevens *et al.*, 2003). Un factor importante que contribuye a la mortalidad y morbilidad son la falta de comprensión de la patogenia de esta enfermedad (Kim, 2012).

2.6. GRUPOS FILOGENÉTICOS

Dentro del género *Escherichia* han sido descritas especies como *E. fergusonii* (Farmer *et al.*, 1985) y *E. albertii*, la cual fue posteriormente descrita como segunda especie nueva (Huys *et al.*, 2003). También fue descrita la relación evolutiva entre *E. albertii* y *E. coli*, como resultado de esta relación, la identidad de *Shigella boydii* serotipo 7 y 13 (Hyma *et al.*, 2005). Por otro lado se concluyó que todas las especies y serotipos de *Shigella* nombrados son en realidad miembros de *E. coli* (Sims y Kim, 2011). Además, existen otras 3 especies nombradas de *Escherichia*: *E. blattae*, *E. vulneris* y *E. hermannii*, pero las cepas de estas especies están solo relacionadas distantemente de otras *Escherichia* y no son miembros válidos del género (Walk *et al.*, 2009).

MLST es una técnica muy importante ya que ha contribuido al entendimiento de la evolución, ecología, epidemiología y genética de poblaciones de bacterias (Maiden *et al.*, 1998). Existen 3 esquemas MLST usados para *E. coli* y estos datos MLST han sido colectados para una gran cantidad de aislados, los cuales están disponibles en la web (<http://mlst.ucc.ie/mlst/dbs/Ecoli>, www.pasteur.fr/recherche/genopole/PF8/mlst/EColi.html y <http://www.shigatox.net/stec/cgi-bin/index>). Junto con el crecimiento de base de datos MLST, hay un número creciente de estudios que aíslan y caracterizan a *E. coli* a partir de fuentes no clínicas (Gordon y Cowling, 2003; Wirth *et al.*, 2006; Walk *et al.*, 2007). Estos estudios han revelado más variación genética del género *Escherichia*, y también fueron descritos 5 clados crípticos dentro del mismo (Walk *et al.*, 2009). El término clado críptico fue usado por los métodos de fenotipificación estándar, cepas relacionadas a estas nuevas especies de *Escherichia* son fenotípicamente indistinguibles de *E. coli*.

Durante mucho tiempo se ha reconocido que existe una considerable subestructura genética en *E. coli* (Chauduri y Henderson, 2012). Ochman y Selander (1984), elaboraron una colección de referencia de *E. coli* (ECOR) sometiendo 11 loci que codifican enzimas a la prueba MLEE y obtuvo como resultado 72 ECOR. Herzer *et al.* (1990), sometieron a las 72 ECOR a la prueba MLEE utilizando 38 loci que codifican enzimas dando como resultado una distribución de cuatro grupos filogenéticos principales: A, B1, B2 y D. Las relaciones filogenéticas entre cepas se determinaron mediante el análisis de la matriz de distancia genética por el método NJ. El uso de esta distribución filogenética de *E. coli* ha sido reforzada por otros estudios (Desjardins *et al.*, 1995; Wirth *et al.*, 2006); aunque, en la actualidad otros trabajos reconocen la existencia de grupos filogenéticos conocidos como C y F; Las cepas del grupo filogenético C, están estrechamente relacionadas con cepas del grupo filogenético B1, y las cepas del grupo filogenético F están relacionadas con cepas B1 y D (Tenailon *et al.*, 2010). Existe también el grupo filogenético E del cual O157:H7 es el miembro más conocido (Chauduri y Henderson, 2012).

Los grupos A y B1 son considerados como grupos hermanos y el grupo B2 es considerado como el grupo filogenético que representa el linaje ancestral de *E. coli* (Lecointre *et al.*, 1998). El tamaño del genoma varía entre los cuatro filogrupos con cepas A y B1 que tienen genomas más pequeños que las cepas B2 o D (Bergthorsson y Ochman, 1998). La distribución (presencia / ausencia) de una variedad de genes que se cree que permitirá a una cepa causar enfermedad extraintestinal también varía entre las cepas de los cuatro filogrupos

(Johnson *et al.*, 2001). Las cepas de los grupos B2 y D son aislados con menos frecuencia del medio ambiente, de los peces, ranas y reptiles que de las cepas A o B1 (Gordon y Cowling, 2003; Walk *et al.*, 2007). En los mamíferos, las cepas del grupo B2 son aisladas con mayor frecuencia a partir de los hospedadores que poseen modificaciones para la fermentación microbiana del intestino grueso (Gordon y Cowling, 2003). Las cepas del grupo B2 han demostrado persistir durante periodos más largos en los lactantes que otras cepas de *E. coli* (Nowrouzian *et al.*, 2006).

Entre los humanos que viven en países desarrollados, como Australis, Estados Unidos y Europa, la cepa B1 es reportada con menos frecuencia que cepas relacionadas a otros grupos filogenéticos. En contraste cepas de los grupos filogenéticos A y B1 parecen ser predominantes en humanos que viven en países en vías de desarrollo (Gordon y Cowling, 2003; Li *et al.*, 2010; Tenaillon *et al.*, 2010;). En resumen las cepas responsables de la infección extraintestinal pueden provenir de cualquiera de los filogrupos de *E. coli*, aunque la mayoría de los aislados son miembros del grupo filogenético B2 y en menor medida, D.

En el 2000 Clermont *et al.* elaboraron una estrategia basada en el PCR *triplex* para la asignación rápida de aislados de *E. coli* a cada filogrupo. Esta estrategia utilizó tres marcadores filogenéticos: dos genes, *chuA* (que cumple la función de sideróforo), *yjaA* (involucrada en la respuesta al estrés de *E. coli* al peróxido de hidrógeno, cadmio y ácido; así como a la formación de biopelículas [Lee *et al.*, 2009]) y un fragmento de anónimo TSPE4.C2 (ligado a un gen putativo de esterase lipasa [Gordon *et al.*, 2008]).

Los genes *chuA* (1983 pb), *yjaA* (384 pb), y el fragmento TSPE4.C2 (contenida en el gen esterase lipasa putativo de 909, 921 ó 984 pb de acuerdo a la cepa) están en sintenia entre las diferentes cepas. El gen *chuA* está entre *yhiF* y *yhiD*, y cuando no se encuentra en la cepa, todo el operón de 9 kb, que está constituido por *chuS*, *chuA*, *chutT*, *chuW*, *chuX*, *chuY*, *chuU* y *hmuV*, está ausente. El gen *yjaA* está flanqueado por *rrfE* y *yjaB*, y cuando está ausente, solo encontramos estos dos últimos. El fragmento TSPE4.C2 se sitúa entre *yiiD* y *yiiE*, y cuando está ausente, solo el gen esterase lipasa putativo está ausente. Cuando uno de estos tres genes está ausente de la cepa estos no van a ser reemplazados por otros fragmentos de ADN (Gordon *et al.*, 2008).

En un estudio en el que se utilizó la prueba MLST para agrupación filogenética se pudo asignar al 85-90 % de las cepas analizadas y el 80-85% de las cepas asignadas a un filogrupa con el método de Clermont fue correcto (Gordon *et al.*, 2008).

El método de Clermont *et al.* (2000) ha sido utilizado en diferentes estudios (Duriez *et al.*, 2001; Higgins *et al.*, 2007; Orsi *et al.*, 2007; Jauregui *et al.*, 2008; Hannah *et al.*, 2009; Doumith *et al.*, 2012) y hasta enero del 2015 ha tenido 1056 citaciones en la web científica Thomson Reuters (Clermont *et al.*, 2015).

2.7. CARACTERIZACIÓN

La edad, la especie animal afectada, los signos clínicos y la duración de la enfermedad puede sugerir el tipo de infección y la categoría de la enfermedad. La selección de muestras, los procedimientos de laboratorio para diagnóstico el apropiado tratamiento, y medidas de control son influenciadas por la historia, el progreso de la enfermedad y el sistema u órgano afectado.

En el diagnóstico de infecciones oportunistas causadas por *E. coli*, es suficiente aislarla en un crecimiento casi puro a partir de muestras tomadas cuidadosamente como de hisopados cervicales, muestras de leche mastítica y orina. El cultivo se realiza en agar MacConkey o agar sangre y es incubada a 37° C por 24 h a 48 h (Manning, 2010; Quinn *et al.* 2011). Criterios de identificación para los aislados: Las colonias de *E. coli* en agar sangre son grises, circulares y brillantes con un olor característico. Estas colonias pueden ser hemolíticas o no hemolíticas; colonias en agar MacConkey son de color rosa brillante; la prueba IMViC puede ser usada para la confirmación; las colonias de algunas cepas de *E. coli* tienen un brillo metálico en agar EMB; un perfil bioquímico puede ser necesario para identificar aislados de mastitis coliforme o cistitis (Quinn *et al.*, 2011). En casos sospechosos de colisepticemia, el aislamiento del organismo en cultivo puro a partir de sangre o de tejido parenquimatoso es considerado confirmatorio. Cuando se sospecha de ETEC, cualquiera de sus enterotoxinas o antígenos fimbriales pueden ser confirmadas por métodos inmunológicos o técnicas moleculares tales como PCR (Thorns *et al.*, 1989; Carroll *et al.*, 1990; DeRoy y Maddox 2001). La prueba diagnóstica de cada patotipo es mencionada en el punto 2.5.

2.7.1. TIPIFICACIÓN

Es importante establecer relaciones entre las diferentes cepas de bacterias para la

identificación de brotes, determinación de la fuente de infección, establecimiento de vías de transmisión, obtención de conocimientos sobre la distribución global de los patógenos para comprender cómo han evolucionado estos patógenos, y el tratamiento de enfermedades (van Belkum *et al.*, 2001; Li *et al.*, 2009; Sabat *et al.*, 2013). A través de los años, muchos métodos de tipificación han sido establecidos para ayudarnos en este entendimiento. Algunos de los primeros métodos estuvieron basados en la tipificación fenotípica, incluyendo pruebas basadas en la bioquímica y serotipificación, mientras que los métodos más modernos están basados en los componentes genéticos de las bacterias; como por ejemplo, la presencia o ausencia, o número de marcadores genéticos específicos (van Belkum *et al.*, 2001; Li *et al.*, 2009; Sabat *et al.*, 2013).

Los métodos de tipificación varían de acuerdo a su poder de discriminación, reproductibilidad, facilidad de ejecución, facilidad de interpretación y costo (van Belkum *et al.*, 2001; Karama y Gyles, 2010). La elección del método más apropiado dependerá del propósito de la tipificación, recursos disponibles, resultado deseado y nivel de discriminación requerido. Existen algunas ventajas y desventajas asociadas con los diferentes métodos de tipificación (van Belkum *et al.*, 2001; Karama y Gyles, 2010; Rivas *et al.*, 2015).

El perfil bioquímico involucra la reacción de un aislado en particular a un rango de pruebas bioquímicas las cuales pueden incluir fermentación de diversas fuentes de carbono. La huella metabólica resultante del aislado puede ser analizada por matrices fenotípicas disponibles comercialmente (O'Sullivan *et al.*, 2007); la serotipificación, la cual está basada en el esquema tradicional de Kauffman para *E. coli* se basa en el serotipado de los perfiles de antígenos de superficie somático (O), flagelar (H) y capsular (K) (Kaper *et al.*, 2004); MLEE fue desarrollado para la tipificación de aislados de bacterias y se basa en la movilidad electroforética diferencial de enzimas específicas las cuales son separadas usando geles de almidón (Whittam *et al.*, 1983; Selander *et al.*, 1986); MLST es basada en la MLEE pero la diferencia radica en que mientras la MLEE determina la movilidad electroforética de las enzimas, en la MLST se realiza la secuenciación de los genes asociados a estas enzimas (Maiden *et al.*, 1998). El concepto de PCR se desarrolla en el punto 2.7.2 del presente trabajo ya que es la principal prueba utilizada en la parte experimental del proyecto. Podemos mencionar que su variante PCR-*triplex* actualmente ha reemplazado el uso de MLEE y MLST para el análisis filogenético poblacional de *E. coli* debido a su simplicidad y accesibilidad de la tecnología PCR (Gordon *et al.*, 2008; Clermont *et al.*, 2000; Clermont *et al.*, 2013).

2.7.2. REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA (PCR)

La PCR fue desarrollada por Kary Mullis en 1988 y es en esencia replicación de ADN *in vitro* (Madigan *et al.*, 2011). Que nos permite, a través de la clonación molecular, producir y aislar grandes cantidades de una muestra de ADN en particular (Cooper y Hausman *et al.*, 2010).

La PCR es una herramienta poderosa, fácil de usar, muy sensible, altamente específica y eficiente. Durante cada ronda de amplificación la cantidad de producto se duplica, lo que lleva a un aumento exponencial del ADN. Esto significa que no solo una gran cantidad de ADN puede ser amplificado en unas pocas horas sino que también se necesitan unas pocas moléculas de ADN diana para iniciar la reacción (Madigan *et al.*, 2011). La amplificación exponencial de un fragmento específico de ADN, usando la PCR, está determinado por secuencias introducidas en la reacción, denominadas partidores, cebadores o primers, y a partir de los cuales la enzima ADN polimerasa, realiza la síntesis exponencial.

Cada ciclo de amplificación consta de tres etapas (Corvalán, 2002): desnaturalización, durante esta etapa, se rompen los enlaces que mantienen el ADN como una hebra doble dando lugar a una monocatenaria. Las dos cadenas se separan por el aumento de temperatura, lo que se denomina desnaturalización; para que ocurra este proceso, la temperatura debe elevarse a 93 ó 96° C (Erich, 1989; Elnifro *et al.*, 2000 Salazar *et al.*, 2013); hibridación o alineamiento, en este paso la mezcla de la reacción se enfría a 50 – 60° C, permitiendo a los cebadores unirse a la porción específica del ADN monocatenario para la que han sido diseñados. Se requieren dos cebadores, uno que es complementario a la cadena diana orientada hacia 3' → 5' y otro cebador que es complementario a la otra hebra con orientación 5' → 3' (Erich, 1989; Elnifro *et al.*, 2000; Salazar *et al.*, 2013); y finalmente la extensión, en esta fase, los cebadores se extienden a lo largo de la secuencia diana utilizando la taq polimerasa en presencia de dNTP y así lográndose la duplicación del ADN diana. La temperatura de trabajo ideal para la Taq polimerasa es de 72° C (Erich, 1989; Elnifro *et al.*, 2000; Salazar *et al.*, 2013).

Los reactivos de la reacción incluyen: ADN plantilla o diana, se puede realizar la amplificación del ADN diana por PCR si está presente por los menos una muestra intacta de esta. Si el número de ejemplares del gen diana es mayor, también lo será la probabilidad de que tenga éxito la amplificación del ADN (Erich, 1989; Elnifro *et al.*, 2000; Salazar *et al.*, 2013); desoxirribonucleótidos trifosfato (dNTPs), son la materia prima necesaria para la síntesis de ADN. La concentración de cada uno de ellos debe estar entre 20 – 200 µM y los

cuatro dNTP deben utilizarse a concentraciones equivalentes para minimizar los errores de incorporación (Innis *et al.*, 1988); Los cebadores, delimitan la zona del ADN a amplificar y al ser reconocidos por la Taq polimerasa permiten iniciar la reacción (Bolívar y García-Lugo, 2014). Siempre que se conozca la secuencia de nucleótidos del ADN diana que queremos amplificar, se pueden diseñar cebadores que inicien la síntesis de ADN en el punto deseado. Los cebadores son habitualmente oligonucleótidos sintetizados químicamente, compuestos de 15 a 20 pares de bases. Dos primers inician la síntesis de ADN en direcciones opuestas desde hebras opuestas (Cooper y Hausman, 2010); La Taq polimerasa, se utiliza el ADN polimerasa de bacterias termoestables para poder soportar los múltiples ciclos de calentamiento y enfriamiento que se llevan a cabo en los termocicladores (Cooper y Hausman, 2010). EL ADN polimerasa de *Thermus aquaticus* (Taq polimerasa) es homóloga a la ADN polimerasa I (Pol I) de *E. coli* (Eom *et al.*, 1996). ADN polimerasas son enzimas que pueden sintetizar una nueva hebra de ADN a partir de desoxirribonucleótidos trifosfato (dNTPs) utilizando una cadena de ADN de diana y un cebador con un extremo 3' OH para iniciar el proceso de copia (Erich, 1989) y cloruro de magnesio (Liu, 2010).

Esta técnica ha evolucionado desde su invención. En la actualidad, gracias a los múltiples sistemas de detección, variantes en los iniciadores y cantidad de pares de primers empleada, se dispone de diversas variantes de la técnica: **PCR concencional**, se basa en la detección de producto de amplificación mediante una electroforesis en gel de agarosa o acrilamida. El producto amplificado se visualiza mediante una banda en el gel. La intensidad de la banda se considera proporcional a la cantidad de producto amplificado y su longitud se verifica interpolando contra un marcador de peso molecular comercial. **PCR cualitativa**, esta modalidad de PCR permite detectar la presencia o ausencia de un afragmento de ADN determinado; es decir, solo se reporta si una muestra es positiva o negativa ante la presencia de un determinado ADN. **PCR semicuantitativa**, permite conocer los niveles de exprecion de un gen en particular, y normaliza los niveles encontrados de este gen (ARNm) con los encontrados en un gen de expresión constitutiva, que se expresa de manera constante en la célula. Al realizar una relación entre la expresión del gen de interés con la expresión del gen constitutivo el índice que se obtenga indicará la expresión real del gen de interés y se reporta como porcentaje de expresión. **PCR cuantitativa**, el producto es cuantificable, lo que permite reportar en números absolutos la cantidad de un microorganismo o del ARNm de un gen de muestra. PCR anidada, esta variante proporciona mayor sensibilidad a la técnica, al amplificar las secuencias de ADN en dos rondas de amplificación con distitintos pares de primers en

cada una. Osea es, primero se realiza una PCR con un a par de cebadores externos para amplificar una región de ADN extensa, que contiene el segmento diana que se desea amplificar y después este producto de amplificación sirve de molde para una segunda PCR con otro par de iniciadores para amplificar una región más pequeña. **PCR en tiempo real**, lo que cambia en esta variante es el método de teccion del producto amplificado y su temporalidad; osea, la detección de las copias del producto de PCR se realiza al mismo tiempo que sucede la amplificación. Y **PCR multiple**, en este tipo de PCR se realiza la amplificación de más de un fragmento de ADN en una sola reacción de PCR con dos o más juegos de primers (cada juego para un gen en particular). Tiene la ventaja de que ahorra tiempo y reactivos, pero presenta el inconveniente de que el diseño de los primers debe ser adecuado para que no se complementen entre ellos (hibridaciones indeseadas). La PCR multiple o multiplex puede emplearse para la búsqueda de varias delecciones, mutaciones y polimorfismos en un solo gen o en múltiples. Esta técnica se utiliza para el análisis simultaneo de multiples marcadores moleculares asociados a alguna enfermedad, para la detección simultanea de varios agentes patógenos, organismos genéticamente modificados o en la determinación de grupos filogenéticos, como es el en caso de *E. coli*.

2.8. COLIBACILOSIS EN ALPACAS

2.8.1. EPIDEMIOLOGÍA

La colibacilosis es una enfermedad infecciosa que constituye un factor limitante de gran magnitud en la producción de camélidos sudamericanos. La alta morbilidad y mortalidad causada, en mayor medida en las crías de alpacas, se traduce en grandes pérdidas económicas (Fernández-Baca, 2005). Las enfermedades infecciosas son la principal causa de mortalidad en las crías y su presentación esta asociada a una transferencia pobre de la inmunidad de la madre a las crías a través del calostro (Garmendia *et al.*, 1987). Si el calostro se da de manera correcta, esta favorece a la supervivencia de las crías (Ameghino y DeMartini, 1991); por lo tanto, la ingestión de calostro es esencial para la supervivencia del recién nacido. El fracaso de la transferencia pasiva de anticuerpos es el principal determinante de la enfermedad septicémica, modula la ocurrencia de la mortalidad y gravedad de la enfermedad entérica y respiratoria en la vida temprana, afectando el rendimiento en edades mas tardías (Wernery, 2001).

En general, la diarrea colibacilar neonatal se presenta con mayor frecuencia en los terneros, corderos y lechones de 1-3 días después del nacimiento siendo esta la enfermedad entérica más comúnmente diagnosticada en los animales jóvenes (Wray y Morris, 1985) y en el caso de crías de alpaca las principales causas de mortalidad neonatal son las enfermedades infecciosas y manejo inadecuado (Ameghino y De Martini, 1991).

En la Estación Experimental de Camélidos Sudamericanos La Raya se determinó que la tasa de mortalidad de camélidos durante un periodo de 3 años fue del 12 % (Bustinza *et al.*, 1988). La mortalidad dentro de los 3 o 4 meses de vida alcanzan cifras elevadas que en algunos casos superan el 50 % de los animales nacidos (Fernández Baca, 2005) pudiendo llegar hasta el 80 % (Bustinza *et al.*, 2001).

Por otro lado, los patógenos entéricos asociados a la diarrea neonatal en los camélidos sudamericanos son los rotavirus, coronavirus, determinadas cepas de *E. coli*, *Cryptosporidium* spp., *Giardia* spp. y *Coccidia* (Rulofson *et al.*, 2001; Rosadio y Ameghino, 1994; Cebra *et al.*, 2003; Whitehead y Anderson, 2006; Foster *et al.*, 2008; Waitt *et al.*, 2008). Morales *et al.* (2007) concluyó que la asociación entre rotavirus, el biotipo de la *E. coli*, y el antígeno fimbrial F41 podría ser la causa de diarrea en el 18.8 % del 30 – 40 % de la población de alpacas neonatas afectadas.

En otro estudio, a partir de muestras fecales de 51 alpacas menores de 50 días de edad, cuya muerte estuvo asociada a diarreas o presentaban signos clínicos de diarrea, se aisló *E. coli*. Las alpacas hospedan cepas enteropatógenas (EPEC) y enterohemorrágicas (EHEC) potencialmente productoras de procesos diarreicos, y algunas de ellas son capaces de desencadenar infecciones fatales en crías a edades muy tempranas (Luna *et al.*, 2012). Cid *et al.*, 2011 concluyó que cepas EPEC y VTEC pueden ser la principal causa de diarrea en alpacas en la región andina del Perú.

2.8.2. MANIFESTACIONES CLÍNICAS

Los signos clínicos más característicos de la colibacilosis, son diarrea profusa con heces de color blanquecino, blanco amarillento o blanco verdoso, acompañada de pérdida de peso, abdomen abultado, postración, acidosis, pérdida de peso hasta caquexia y muerte, no hay

temperatura elevada (Moro, 1965; Alva y Calderón, 1987), algunas crías pueden presentar apetito depravado ingiriendo tierra y piedrecillas. La diarrea puede persistir por varios días (5-20) y cursa con deshidratación, pérdida de peso. La mayoría de casos ocurren en lugares donde se mantienen los animales en corrales sucios, húmedos y con bastante barro. En resumen, las crías se muestran muy débiles, deprimidas, postradas y luego mueren, aunque algunas crías se recuperan (Moro, 1965; Alva y Calderon, 1987).

2.8.3. HALLAZGOS DE NECROPSIA

En un estudio, realizado en la localidad de Nuñoa-Puno, de 148 alpacas, siete murieron con lesiones compatibles con colibacilosis y se realizó la necropsia, se encontraron lesiones con las siguientes características: moderada a severa acumulación de fluido intraluminal, acompañados de moderada a severa hiperemia, y regular a pobre estado de carnes (Palacios *et al.*, 2005). Esta información es compatible con otras realizadas anteriormente en la que se agrega la no presencia de gas en el intestino (Moro, 1965).

La descripción histopatológica fue realizada por Palacios *et al.* (2005) y determinó lesiones variables en yeyuno: 3 casos con vellosidades alargadas, llegando a fusionarse en algunas zonas, el epitelio intacto con discreta hiperplasia de células caliciformes, y el corion con leve a moderada infiltración linfoplásmica e hiperemia. Otros 4 casos presentaron vellosidades del yeyuno menos alargadas en comparación con las primeras, el epitelio con descamación profusamente en muchas zonas, quedando expuesta la membrana basal (Palacios *et al.*, 2005). Foster *et al.* (2008) describe enteropatía en tres crías de alpaca con evidencia histopatológica de lesiones intestinales AE (attaching and effacing). Esto se fue confirmado por microscopia electrónica en un caso donde la mucosa estaba aplanada en algunas zonas con varias colonias bacterianas cocobacilares íntimamente adheridas a la superficie de los enterocitos de vellosidades y en enterocitos desprendidos.

2.8.4. DIAGNOSTICO

El diagnóstico de la causa de la diarrea aguda implica una cuidadosa colección de la historia, estado físico y pruebas de laboratorio. Además se debe determinar si la diarrea es el problema primario o parte de un síndrome o complejo infeccioso. Los camélidos con diarrea primaria tienden a tener diarrea profusa, heces acuosas y menos evidencia de enfermedad sistémica. Los signos de enfermedad sistémica que sugieren más que una simple enfermedad diarreica

incluyen fiebre, cólicos (peritonitis o intoxicaciones), vómitos (por envenenamiento) o distensión abdominal (por problemas hepáticos) (Whitehead y Anderson, 2006; Whitehead y Cebra, 2010; Cebra, 2010). Pruebas de laboratorio de enfermedades más complejas incluyen neutropenia o un cambio degenerativo hacia la izquierda, alta concentración de enzimas hepáticas y anomalías en líquido peritoneal (conteo alto de células, concentración de proteínas o presencia de microbios). El crecimiento de *E. coli* a partir de muestras recolectadas de heces no son suficiente para confirmar su papel en la enfermedad; de manera contraria, el crecimiento positivo a partir de muestras tomadas de sangre o fluido peritoneal son compatibles con sepsis y son más confirmatorias (Whitehead y Anderson, 2006; Whitehead y Cebra, 2010 ; Cebra, 2010). Para el diagnóstico de *E. coli* patógenas algunas de las siguientes metodologías son necesarias: serotipificación, prueba de adherencia sobre células HEp-2, tinción fluorescente para actina, diferentes técnicas de biología molecular para amplificar los genes que codifican factores de virulencia (Sack *et al.*, 1980; Thompson *et al.*, 1986; Chapman *et al.*, 1991; Zadik *et al.*, 1993; Cobeljić *et al.*, 1996; Nataro y Kaper, 1998; Vidal *et al.*, 2005; Dudley *et al.*, 2006; Sjoling *et al.*, 2007; Kodner y Thomas Gupton, 2010).

2.8.5. DIAGNOSTICO DIFERENCIAL

La mayoría de bacterias se asocian con los más graves síndromes de enteritis con signos sistémicos. *E. coli* y otros organismos coliformes han sido aislados de sangre y tejidos postmortem; pero siempre es difícil de interpretar si son invasores primarios o colonizadores de lesiones preexistentes (Whitehead y Cebra, 2010 ; Cebra, 2010).

Evidencia convincente de un proceso ulceroso predisponente producido por coccidiosis, gusanos gastrointestinales, acidosis, impactación o bezoar normalmente existen en animales viejos. La mayoría de infecciones por coliformes parecen ser oportunistas y afectar de manera individual a los animales y con lesión preexistente que pueda facilitar la infección.

Salmonella es un problema relativamente raro, pero la prevalencia parece aumentar con el tamaño del rebaño, ocasiona diarrea y esta es generalmente leve en comparación con el grado de depresión. *Salmonella* es generalmente considerado como un patógeno virulento y no requiere coinfección o daño previo (Whitehead y Cebra, 2010; Cebra, 2010).

Clostridium prefringens es la causa más conocida de enteritis en crías de alpaca. Existe evidencia que sugiere que *C. prefringens*, un invasor secundario de tejidos dañados por coccidiosis, giardiasis o infección por coronavirus (Whitehead y Cebra, 2010; Cebra, 2010; Rosadio *et al.*, 2012). Se observa depresión rápidamente progresiva, anorexia, postración, timpanismo, cólicos, coma y la muerte suele ser rápida. El volumen de diarrea disminuye cuando la clostridiosis se convierte en la condición dominante y esta se torna sanguinolenta.

Otros agentes patógenos están asociados a la diarrea neonatal, como virus: coronavirus, rotavirus (Morales *et al.*, 2007; López *et al.*, 2011); parásitos: *Cryptosporidium*, *Giardia*, *Eimeria* y *Trichuris* (Whitehead y Cebra, 2010 ; Cebra, 2010). Antígenos de rotavirus y coronavirus fueron detectados en heces de crías de alpaca con diarrea. Se culpa a coronavirus de causar enfermedad diarreica en los recién nacidos y también de causar enfermedad en adultos (Morales *et al.*, 2007; López *et al.*, 2011).

2.8.6. PREVENCIÓN Y CONTROL

Animales recién nacidos deben recibir una adecuada cantidad de calostro poco después del nacimiento. Los anticuerpos calostrales pueden prevenir la colonización del intestino por parte de *E. coli* patógenas. Las crías de alpacas nacen con baja concentración de inmunoglobulina gamma, debido al tipo de placenta de los camélidos (epiteliocorial difusa). El calostro de los camélidos contiene, principalmente, inmunoglobulina G (IgG) y la eficacia de su absorción disminuye hasta las 24 horas de vida (Bravo *et al.*, 1997; Wernery, 2001, Tibary *et al.*, 2010). Las concentraciones de IgG aumentan rápidamente después de la ingestión del calostro en las crías y alcanzan un pico entre las 24 y 48 horas de vida, luego empiezan a declinar de forma continuada (Bravo *et al.*, 1997; Wernery, 2001, Tibary *et al.*, 2010).

En cuanto al tratamiento, debido a la naturaleza compleja de la diarrea, no siempre se obtiene resultados satisfactorios, como profiláctico o terapéutico. El tratamiento de rehidratación para el reemplazo de electrolitos es de suma importancia para las crías enfermas. Una vez que se ha presentado la enfermedad se podrá practicar lo siguiente: Separar a las crías enfermas y tratarlas individualmente, conducir al resto del rebaño a pastos de buena calidad y suministrar productos antimicrobianos (Ameghino y De Martini, 1991).

2.8.7. IMPORTANCIA EN SALUD PUBLICA

Como se describió anteriormente, *E. coli* se encuentra en el suelo, agua, lodo y en todo el entorno natural; sin embargo, cepas de *E. coli* están específicamente adaptados a vivir en el intestino de animales de sangre caliente. *E. coli* constituye el 10% de los microorganismos intestinales de animales y humanos; en consecuencia, existen coliformes en heces humanas que son patógenas. Por lo tanto, *E. coli* es considerada un riesgo contaminante no solo en el agua sino en alimentos; además, en los últimos años ha habido un incremento de reportes de alimentos contaminados por *E. coli* (CDC, 2004; Erickson *et al.*, 2007). Como un contaminante del agua, *E. coli* fue elegido como indicador de la cantidad de nivel de heces humanas en el agua, siendo el monitoreo de los niveles de contaminación por *E. coli*, importantes porque las diferencias entre cepas de patógenas y no patógenas son a menudo detectables solo a nivel molecular; sin embargo, muchas de estas diferencias provocan cambios en la fisiología o ciclo de vida de la bacteria (Pearson, 2007).

Nuevas cepas de *E. coli* surgen todo el tiempo de procesos biológicos de variabilidad genética (por ejemplo: mutación, HTG [Ochman *et al.*, 2000]) y algunas de estas cepas desarrollan características que pueden ser perjudiciales para su hospedero. Aunque en individuos sanos cepas patógenas probablemente solo causen más que un episodio de diarrea. En los individuos más jóvenes o los inmunocomprometidos estas cepas virulentas pueden causar enfermedades graves o incluso la muerte. Un ejemplo reciente de la evolución de una cepa virulenta está representado por *E. coli* O157:H7, el cual posee el fago *stx*, el cual transporta los genes que codifican a Stx (Blanco *et al.*, 2004; Kaper *et al.*, 2004). La toxina Shiga ha llevado y está conduciendo la aparición de patógenos productores de Stx y desde la aparición de *E. coli* O157:H7 como causa de enfermedad humana significativa, se han reportado más de 500 diferentes serogrupos de *E. coli* que producen Stx (Kaper *et al.*, 2004; Zhou *et al.*, 2010).

Infección por STEC es una enfermedad de notificación obligatoria en USA y en muchos otros países (Chang *et al.*, 2009). Es altamente prevalente en USA, en países europeos, Reino Unido, Japón, Sudamérica y Australia. En USA, seguido del primer brote en 1982, el número y severidad de los brotes ha aumentado dramáticamente (CDC, 2012). STEC causa 265,000 casos al año en USA (Scallan *et al.*, 2011) y *E. coli* O157:H7 es el serotipo STEC responsable de enfermedad en USA (Tarr *et al.*, 2005), causando más de 96,000 casos de enfermedad y 17 brotes anualmente. Desde 1982 hasta 2002 se han reportado 350 brotes de *E. coli* O157:H7 en USA (Scallan *et al.*, 2011). La epidemiología de STEC en Sudamérica es marcada por una

incidencia notablemente baja del serotipo *E. coli* O157:H7 (Lopez *et al.*, 1995; Aidar-Ugrinovich *et al.*, 2007). En Argentina *E. coli* O157:H7 fue aislado de 0 – 18 % de casos de STEC, 9 % en Chile y ningún caso en Uruguay. Un brote que se origino en Alemania en Mayo del 2011y que luego se extendió a la mayoría de países de Europa y del que se identifico 4200 casos a nivel mundial, estuvo marcado por una sorprendente alta tasa de HUS (22%) y colitis hemorrágica (78%) (Buchholz *et al.*, 2011; Rasko *et al.*, 2011; Wu *et al.*, 2011).

Enfermedades diarreicas son la principal causa de muerte en países en vías de desarrollo, donde más de la quinta parte de todas las muertes son de niños menores de 5 años y se puede atribuir a la diarrea infecciosa (Kosek *et al.*, 2003). En conjunto , se estima que los patógenos diarreicos causan entre 1 a 2 millones de muertes anualmente (Kosek *et al.*, 2003; Boschi-Pinto *et al.*, 2008). ETEC contribuye significativamente a la mortalidad asociada con enfermedad diarreica, ocasionando ciento de miles de enfermedades cada año. ETEC esta relacionada con los casos de diarrea presente en los viajeros principalmente que provienen de países con un adecuado saneamiento y arriban a países con un pobre sistema sanitario (Black, 1990; Sack, 1990; Subekti *et al.*, 2003); sin embargo, a pesar de la clara preponderancia de infecciones por ETEC en países en vías de desarrollo, una serie de brotes de ETEC a gran escala en USA confirma el hecho de que incluso en países industrializados estos organismos pueden causar daños graves (Rosenberg *et al.*, 1977; Dalton *et al.*, 1999; Beatty *et al.*, 2004; Devasia *et al.*, 2006).

La epidemiología de EAEC es pobremente entendida. No existe evidencia de un reservorio animal de la bacteria (Huang *et al.*, 2004) y brotes de origen alimentario han sido descritos (Itoh *et al.*, 1997). Los factores de riesgo para la infección EAEC incluyen viajes a países en desarrollo, ingestión de comida y agua contaminada, pobre higiene, susceptibilidad del huésped y posiblemente inmunosupresión (Nataro *et al.*, 1985; Okeke y Nataro, 2001; Huang y Dupont, 2004). El primer brote reportado ocurrió en una guardería de Serbia en 1995 (Cobeljic *et al.*, 1996); de los 19 niños afectados, 3 desarrollaron diarrea persistente. Ha habido dos brotes de EAEC reportados en Ciudad de México (Eslava *et al.*, 1993). Itoh *et al.* (1997) describieron un brote masivo de diarrea por EAEC entre los niños de japoneses, afectando cerca a 2700 de ellos. En Francia ocurrió un brote de HUS causada por EAEC productora de toxina Shiga y se han atribuido a serotipos O111:H2, O111:H21 y O104:H4 (Morabito *et al.*, 1998; Frank *et al.*, 2011).

Patotipos diarreogénicos de *E. coli* han sido estudiados en poblaciones pediátricas y en adultos en el Perú usando una variedad de métodos de diagnóstico (serotipificación, cultivo de tejidos, ELISA, etc). Sin embargo, una búsqueda de los seis grupos de *E. coli* diarreogénicos reconocidos no se ha hecho en el Perú hasta la última década. Estudios anteriores (1991 – 2004) (sin utilizar métodos moleculares) encontraron la prevalencia de EPEC en niños dentro de 1 – 28 % (Valera *et al.*, 2010).

E. coli diarreogénica como grupo es responsable en promedio del 34 % de todos los casos de diarrea de niños peruanos que viven en Lima. La tasa de aislamiento y la frecuencia relativa de cada patógeno varía en función de la edad de la población de estudio y el tipo de ubicación. Las *E. coli* diarreogénicas aisladas de niños peruanos son muy heterogéneas (múltiples serotipos, genes de virulencia variable y polimorfismos). Los laboratorios de microbiología en el Perú solo cuentan con una única prueba para detectar algunos serotipos de *E. coli* de EPEC y ETEC. Además, los estudios nacionales de investigación epidemiológica de *E. coli* diarreogénica deben incluir no solo las áreas periurbanas de Lima, sino también otras áreas urbanas y rurales del interior del país, donde la higiene no es tan buena (Valera *et al.*, 2010).

III. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. LUGAR DE ESTUDIO

Se realizó el muestreo en las comunidades alpaqueras de Ninacaca, Huayllay y Cochamarca, Pasco; ubicadas por encima de los 3500 msnm. El aislamiento se llevó a cabo en el laboratorio de Microbiología del IVITA El Mantaro en los meses de febrero y marzo del 2014, la PCR-*triplex* se realizó en la Universidad Autónoma de México (UNAM) en agosto del 2014.

3.2. RECOLECCIÓN DE MUESTRAS

La toma de muestras se realizó a través de hisopados rectales de alpacas neonatas con procesos diarreicos. Estos hisopos fueron rotulados y conservados en tubos con medios de transporte bacteriano Stuard (Merck) aproximadamente a 4°C hasta su remisión y posterior procesamiento en el laboratorio.

3.3. CULTIVO Y AISLAMIENTO BACTERIANO

Las cepas fueron cultivadas en el agar McConkey, el cual es selectivo para bacterias gramnegativas aerobias o anaerobias facultativas, incubadas a 37° C por 24 horas. Los

aislados de colonias presuntivas de *E. coli* son identificadas a través de pruebas bioquímicas: sulfoindol, SIM, malonato, urea, citrato de Simmons, lisina, orinitina, arginina; luego de su confirmación las cepas positivas a estas fueron colocadas en agar tripticasa de soya para su mantenimiento hasta su remisión y procesamiento respectivo (Cortés-Ortiz *et al.*, 2002; Corrales *et al.*, 2008)

3.4. EXTRACCION DE ADN

Las cepas obtenidas por los cultivos y pruebas bioquímicas fueron cultivadas en caldo Luria en similares 37° C por 24 horas. Luego se decantan los viales de 1.5 ml y se procede a centrifugar 13000 rpm por 5 minutos. Los viales son colocados en baño María a 100° C por 10 minutos. Terminado ese tiempo las muestras son inmediatamente introducidas en un recipiente con hielo por 5 minutos para ocasionar la lisis celular por el cambio brusco de temperatura. Finalmente se vuelve a centrifugar a 13000 rpm por 5 minutos (Hernández *et al.*, 2009; Gonzáles *et al.*, 2011).

3.5. AMPLIFICACIÓN DE ADN

Luego de realizar la extracción del ADN las muestras serán procesadas con la prueba de PCR-*triplex* basado en el método de Clermont *et al.* (2000). Cada reacción se llevo a cabo mediante el uso de una mezcla de 20 µl: 2 µl de buffer tampón 10x (suministrado con *Taq* polimerasa), 20 pmol de cada cebador, cada desoxinucleósido trifosfato (dNTPs) a una concentración de 2 mM, 2,5 U de *Taq* polimerasa (ATGC Biotechnologie, noisy-le-Grand, Francia), y 200 ng de ADN genómico. La PCR se realizó bajo un protocolo estándar: desnaturalización durante 5 min a 94° C, 30 ciclos de 30 s a 94 ° C, 30 s a 55 ° C, y 30 s a 72 ° C, y un paso de extensión final de 7 min a 72° C. Los pares de cebadores utilizados y los fragmentos que generan se muestran en el cuadro 1.

Cuadro 1. Primers utilizados en la PCR triplex

Marcador genético	Cebador	Estructura	Pares de bases generados
chuA	chuA.1	5'-GACGAACCA ACGGTCAGGAT-3'	279
	chuA.2	5'-TGCCGCCAGTACC AAAGACA-3'	
yjaA	yjaA.1	5'-TGAAGTGTCAGGAGACGCT G-3'	211
	yjaA.2	5'-ATGGAGAATGCGTTCCTCAAC-3'	
TSPE4.C2	TSPE4.C2.1	5'-GAGTAATGTCTGGGGCATTCA-3'	152
	TSPE4.C2.2	5'-CGCGCCAACAAAGTATTACG-3'	

Cuadro 2. Sistema utilizado por Clermont *et al.* (2000) para la agrupación filogenética.

chuA	yjaA	TspE4.C2	Grupo filogenético
-	-	-	A
-	+	-	A
-	-	+	B1
-	+	+	B1
+	+	-	B2
+	+	+	B2
+	-	-	D
+	-	+	D

- : Negativo

+ : Positivo:

IV. RESULTADOS

Siguiendo el esquema de llave dicotómica realizada por Clermont *et al.* (2000) se pudo situar a cada *E. coli* en sugrupo filogenético correspondiente (**A**: chuA -, yjaA ±, TSPE4.C2 -; **B1**: chuA -, yjaA ±, TSPE4.C2 +; **B2**: chuA +, yjaA +, TSPE4.C2 ±; **D**: chuA +, yjaA -, TSPE4.C2 ± [cuadro 2]). Siguiendo este algoritmo se determino que los grupos filogenéticos B1 y D fueron hallados con mayor frecuencia con 65.55% y 19.33 %, respectivamente; el grupo filogenético menos frecuente fue el B2 con 1.68% (cuadro 3).

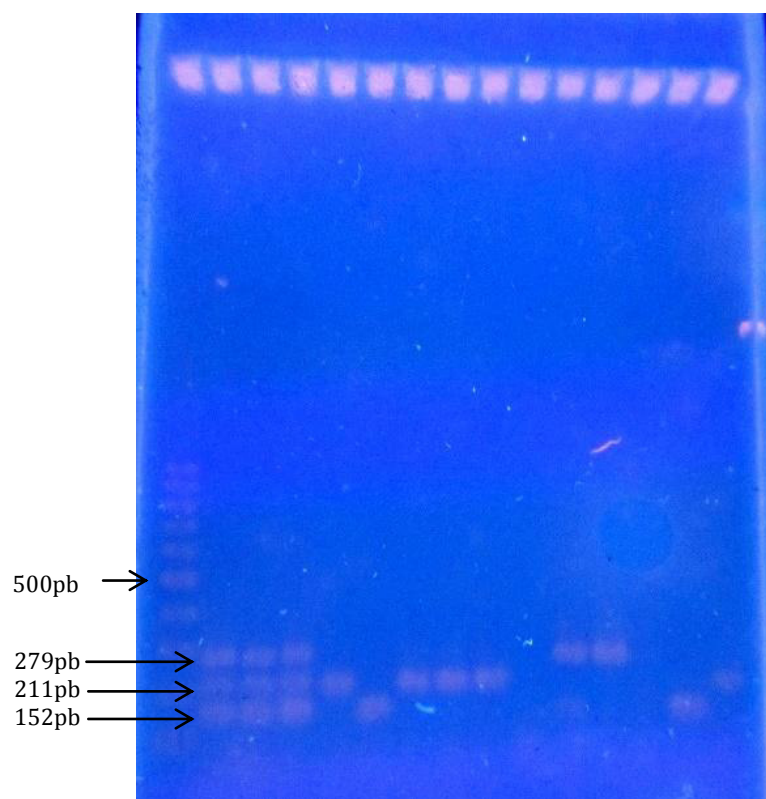
Cuadro 3. Agrupación de la cepas de acuerdo a la llave dicotómica utilizada en el cuadro 1 (n = 119)

Clave*	Grupo filogenético	Total	Frecuencia ± IC%
- - -	A	11	13.45 ± 0.13**
- + -	A	5	
- - +	B1	75	65.55 ± 0.37**
- + +	B1	3	
+ + -	B2	0	1.68 ± 0.46**
+ + +	B2	2	
+ - -	D	11	19.33 ± 1.37**
+ - +	D	12	

*Clave: siguiendo el orden mostrado en el cuadro 2

**intervalo de confianza

Foto 1. Gel de electroforesis de los genes *chuA*, *yjaA*, y *TSPE4.C2* en las muestras evaluadas por PCR triplex



V. DISCUSIÓN

En el presente estudio, se obtuvo que el grupo filogenético B1 predomina (65.55%) seguido de los grupos D (19.33%), A (13.45%) y B2 (1.68%) de 119 muestras. En humanos, las cepas del grupo A son predominantes (40.5%), seguido por cepas del grupo B2 (25.5%), mientras que las cepas del grupo B1 y D son menos comunes (17% para ambos) (Duriez *et al.*, 2001; Escobar-Paramo *et al.*, 2004; Nowrouzian *et al.*, 2009). En animales, predominan las cepas del grupo B1 (41%), seguidas por A (22%), B2 (21%) y en menor grado el grupo D (16%) (Ochman y Selander, 1984a; Gordon y Cowling, 2003; Escobar-Paramo *et al.*, 2006; Skurnik *et al.*, 2006; Baldy-Chudzik *et al.*, 2008). Estas diferencias, posiblemente se deben a características de la especie como la masa corporal, morfología intestinal, tiempo de tránsito intestinal, flora intestinal, dieta, todas estas determinadas por el nicho ecológico en el cual habita la alpaca (Gordon y Cowling, 2003; Power *et al.*, 2005; Li *et al.*, 2010; Tenaillon *et al.*, 2010; O'Brien y Gordon, 2011). Clermont *et al.* (2000) utilizaron 3 marcadores genéticos: dos genes (*chuA*, el gen del receptor hem de membrana externa, y *yjaA*, que codifica una proteína no caracterizada) y un fragmento de ADN (TSP4.C2) (Bonacorsi *et al.*, 2000) que ha sido identificado recientemente como parte de un gen de la esterasa lipasa putativa (Gordon *et al.*, 2008). La creación de una biblioteca sustractiva de dos cepas de *E. coli* que pertenecen a diferentes grupos filogenéticos (Bonacorsi *et al.*, 2000) y la caracterización de un fragmento de ADN fuertemente asociado a cepas de ECNM (Bingen *et al.*, 1994) sugieren que ciertos genes o fragmentos de ADN podrían ser marcadores específicos para grupos filogenéticos (Clermont *et al.*, 2000). Un estudio *in silico* demostró que los marcadores genéticos utilizados

por Clermont *et al* (2000) están en sintenia ya que la población de *E. colies* clonal (Gordon *et al.*, 2008). Por otra parte la distribución filogenética en cuatro grupos principales agrupan cepas con diferentes características; Aunque los primeros estudios sobre la base de MLEE han demostrado que muchos clones de *E. coli* tienen amplias distribuciones geográficas y de hospederos, la diversidad genética observada exhibe componentes tanto ambientales como taxonómicas del anfitrión (Ochman y Selander, 1984a; Goulet y Picard, 1986; Souza *et al.*, 1999).

Los grupos filogenéticos A y B1 abarcan cepas comensales y poco virulentas de *E. coli*. El nicho de cepas de *E. coli* comensales se ubica en el intestino (ciego y colon) de animales de sangre caliente y reptiles. Transita por el suelo y agua, la cual ha convertido en un marcador de contaminación ambiental. Los hospederos de *E. coli* varían de acuerdo al tamaño corporal, morfología intestinal, tiempo de retención de la ingesta y la microflora. Estas últimas características van a influenciar en la prevalencia y densidad de *E. coli*, siendo reportados en humanos con más del 90%, en mamíferos salvajes 23%, aves y reptiles 10% (Gordon y Cowling, 2003; Power *et al.*, 2005; Li *et al.*, 2010; Tenaillon *et al.*, 2010; O'Brien y Gordon, 2011), a nivel de alpacas no se cuentan con esos datos, sin embargo se considera diferente por los ambientes extremos en los que se desarrollan y características de alimentación y ración muy particulares.

Las cepas ExPEC pertenecen principalmente al grupo B2 y en menor proporción al grupo D (Bigen *et al.*, 1998; Boyd y Hartl 1998; Johnson y Stell 2000; Escobar-Páramo *et al.*, 2004; Gordon, 2004). Estos dos grupos son aislados en menor frecuencia del ambiente (Walk *et al.*, 2007) a diferencia de los grupos A y B1 que han sido aislados en peces, ranas y reptiles (Gordon y Cowling, 2003). Existen cambios de prevalencia de los grupos filogenéticos en la población humana. Cepas aisladas de Europa (Francia y Croacia) en la década de los 80s, África (Malí y Benín), Asia (Pakistán) y Sudamérica (Guayana Francesa, Colombia y Bolivia) pertenecen principalmente al grupo filogenético A (55%) y B1 (21%), mientras que las cepas D (14%) y B2 (10%) fueron reportadas en menor proporción (Duriez *et al.*, 2001; Escobar-Paramo *et al.*, 2004; Pallecchi *et al.*, 2007; Nowrouzian *et al.*, 2009). Sin embargo, cepas aisladas de Europa (Francia y Suecia) en la primera década del 2000 y de América del Norte, Japón y Australia pertenecen al grupo B2 (43%), seguido por el grupo A (24%), D (21%) y B1 (12%) (Zhang *et al.*, 2002; Gordon *et al.*, 2005). En este estudio el grupo filogenético reportado con mayor frecuencia es el B1 (65.55%). En el presente estudio las cepas aisladas

de alpacas neonatas pertenecen principalmente al grupo filogenético B1. Los factores socioeconómicos, tales como los hábitos alimenticios y el nivel de higiene, son presumiblemente los principales factores que explican estas distribuciones de los grupos filogenéticos, en lugar de las condiciones genéticas, climáticas, geográficas o propias del hospedero, como factores de inducción evolutiva. Un ejemplo de esto se manifiesta en el cambio de las proporciones de B2 y las cepas A en Francia durante los últimos 20 años. Además, las diferencias morfológicas, fisiológicas y dietéticas que se producen entre los individuos humanos de diferentes sexos o edades influyen en la distribución de los genotipos de *E. coli* (Gordon *et al.*, 2005; Skurnik *et al.*, 2008; Tenaillon *et al.*, 2010). Aun no se han reportado estudios sobre grupos filogenéticos en camélidos sudamericanos *E. coli* en el Perú aislados de alpacas y demás países en los que se crían camélidos sudamericanos.

E. coli es un gramnegativo, no formador de esporas y habitante del intestino de animales de sangre caliente y reptiles. Es el anaerobio facultativo más abundante del intestino y una de las primeras bacterias en colonizar el intestino. Se ha reportado diferentes estudios de cómo *E. coli* afecta a animales y al hombre, tratando de describir la manifestación de signos clínicos y alteraciones fisiológicas (Moro, 1965; Alva y Calderón, 1987; Fernández-Baca, 2005; Whitehead y Anderson, 2006; Morales *et al.*, 2007; Cid *et al.*, 2011; López *et al.*, 2011; Luna *et al.*, 2012; Silvera *et al.*, 2012). Los estudios en el Perú de *E. coli* en alpacas principalmente relacionan a la colibacilosis con la diarrea neonatal pero esto debe ser tomado con cautela ya que *E. coli* se presenta como una infección secundaria a otras enfermedades gastrointestinales, por eso es necesario determinar los patotipos que están involucrados en cuadros diarreicos de crías de alpacas (Cid *et al.*, 2011; Luna *et al.*, 2012; Silvera *et al.*, 2012). Además diversos estudios buscan determinar los factores que dan cabida a que *E. coli* manifieste su virulencia como las características ambientales, manejo, aspectos nutricionales, entre otros (Scaletsky *et al.*, 1984; Nataro *et al.*, 1985; Nataro *et al.*, 1987; Nataro y Kaper, 1998; Kaper *et al.*, 2004).

Para la caracterización de *E. coli*, se realizan diferentes estudios microbiológicos, serológicos y moleculares, que permiten evaluar aspectos de su biología y nos describen su genética poblacional. El serotipo se determina en relación a la frecuencia relativa de los antígenos, los cuales varían de acuerdo a la fuente del aislado, en donde los antígenos O, H, y K se distribuyen de manera no aleatoria, y como muchos serotipos están distribuidos a nivel mundial, fue postulado que la especie *E. coli* se compone de una serie de linajes estables (llamadas clonas), entre las que se produce poca recombinación de genes cromosómicos

(Kauffmann, 1947; Orskov y Orskov, 1984). La MLEE reveló que existen pocos genotipos distintivos, a pesar de la gran diversidad genética global de *E. coli*, y mostró además que los clones aislados, de hospederos temporal y geográficamente distintos, fueron idénticos (Milkman, 1973; Selander y Levin, 1980, Selander *et al.*, 1986). MLST es una poderosa herramienta utilizada en genética de poblaciones bacterianas (Enright y Spratt, 1999); actualmente, tres esquemas MLST están disponibles para *E. coli*, usando cada uno una combinación diferente de genes (Gordon *et al.*, 2008). Los resultados obtenidos con estos tres esquemas están altamente correlacionados, abogando por la robustez de la estructura clonal de las especies (Gordon *et al.*, 2008). La agrupación filogenética mediante PCR- *triplex* nos brinda un enfoque en la que se pueden agrupar a las cepas de *E. coli* en 4 grupos filogenéticos principales (A, B1, B2 y D) (Clermont *et al.*, 2000). La precisión con la que este método asigna cepas a su correcto filogrupo basado en MLST es buena (80-85%) (Gordon *et al.*, 2008). En cuanto a la clonalidad de *E. coli* Feil *et al.* (2001) concluyó que *E. coli* es en gran parte clonal; pero a pesar de esto, no es posible deducir de forma convincente las relaciones ancestrales entre los principales grupos filogenéticos modernos ya sea por cuellos de botella en la población o la recombinación genética frecuente dentro de *E. coli*. Por eso, los análisis iniciales de estructura poblacional de *E. coli* se centraron en clones de larga duración que serían adecuados para el análisis filogenético. Un análisis filogenético, dentro de un contexto clonal de larga duración, identificó 4 grupos filogenéticos predominantes A, B1, B2 y D (Wirth *et al.*, 2006), y es en base a esta agrupación por la que se ha mantenido como prueba principal, la expuesta por Clermont *et al.* (2000) a pesar de que el mismo autor propuso, en un trabajo posterior, el uso de un marcador adicional que resulta en una distribución de 7 grupos filogenéticos (Clermont *et al.*, 2013); también fue propuesta otra agrupación que usó los mismos marcadores genéticos utilizados en el método de Clermont *et al.* (2000) (Escobar-Páramo *et al.*, 2006; Carlos *et al.*, 2010). Un fenograma basado en MLEE que utilizó 38 enzimas identificó a los cuatro grupos filogenéticos principales (A, B1, B2 y D) y dos grupos accesorios (C y E) en *E. coli* Selander *et al.*, 1987; Herzer *et al.*, 1990). Posteriormente se reconoció otro grupo adicional: el grupo filogenético F (Jaureguy *et al.*, 2008); Esto permitió la construcción de una robusta filogenia en la que la primera división de la historia filogenética de *E. coli* conduce a una rama que contiene a las cepas del grupo B2 y un subgrupo dentro de D denominado F (Jaureguy *et al.*, 2008; Touchon *et al.*, 2009; Tenaillon *et al.*, 2010). Las cepas restantes del grupo D salen a continuación por una segunda rama, seguido del grupo E. Por último, los grupos A y B1 aparecen como grupos hermanos (Touchon *et al.*, 2009; Tenaillon *et al.*, 2010).

VI. CONCLUSIONES

Se determinó que el 65.55 % (78 ± 0.37) pertenece al grupo filogenético B1, el 19.33% (23 ± 1.37) pertenece al grupo filogenético D, el 13.45% (16 ± 0.13) pertenece al grupo filogenético A y el 1.68 % (2 ± 0.46) pertenece al grupo filogenético B2.

El 21% (25/119) de cepas aisladas de *E. coli* pertenecen a cepas patógenas extraintestinales (grupos filogenéticos B2 y D) y el 79% (94/119) son cepas comensales.

VII.RECOMENDACIONES

- Relacionar los resultados con el nivel socioeconómico de la región.
- Parear los resultados de la agrupación filogenética con el serotipado de todas las cepas.

VIII. BIBLIOGRAFÍA

1. **Aidar-Ugrinovich L, Blanco J, Blanco M, Blanca J, Leomil L, Dahbi G, Mora A, OnumaD, Silveira W y Pestana de Castro A. 2007.** Serotypes, virulence genes, and intimin types of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* (STEC) and enteropathogenic *E. coli* (EPEC) isolated from calves in Sao Paulo, Brazil. *Int J Food Microbiol* 115 (3): 297 - 306.
2. **Alteri C, Mobley H. 2012.** *Escherichia coli* physiology and metabolism dictates adaptation to diverse host microenvironments. *Current opinion in Microbiology* 15: 3 - 9.
3. **Alva M, Calderón B. 1987.** Uso de la gentamicina en la diarrea de las crías de alpaca. *Rev Cam Sud* 5: 34-42.
4. **Ameghino E, DeMartini J. 1991.** Mortalidad de crías de alpacas. *Bol Div IVITA*, Lima. p 71 - 80.
5. **Baldy-Chudzik K, Mackiewicz P, Stosik M. 2008.** Phylogenetic background, virulence gene profiles, and genomic diversity in commensal *Escherichia coli* isolated from ten mammal species living in one zoo. *Vet Microbiol* 131: 173 - 184.
6. **Bando S, Trabulsi L, Moreira-Filho. 2007.** Genetic relationship of diarrheagenic *Escherichia coli* pathotypes among the enteropathogenic *Escherichia coli* O

serogroup. Memórias do Instituto Oswaldo Cruz 102(2): 169 - 174.

7. **Baumgart M, Dogan B, Rishniw M, Weitzman G, Bosworth B, Yantiss R, Orsi R, Wiedmann M, McDonough P, Kim S, Berg D, Schukken Y, Scherl E y Simpson K. 2007.** Culture independent analysis of ileal mucosa reveals a selective increase in invasive *Escherichia coli* of novel phylogeny relative to depletion of Clostridiales in Crohn's disease involving the ileum. *Isme J* 1: 403 - 418.
8. **Beatty M, Bopp C, Wells J, Greene K, Puhr N y Mintz E. 2004.** Enterotoxin-producing *Escherichia coli* O169:H41, United States Emerg Infect Dis 10(3): 518 - 521.
9. **Bennett P. 2008.** Plasmid encoded antibiotic resistance: acquisition and transfer of antibiotic resistance genes in bacteria. *Br J Pharmacol* 153 (1): 347 - 357.
10. **Berg R. 1996.** The indigenous gastrointestinal microflora. *Trends Microbiol.* 4: 430 – 435.
11. **Bergthorsson U, Ochman H. 1998.** Distribution of chromosome length variation in natural isolates of *Escherichia coli*. *Mol biol evol* 15(1): 6 - 16.
12. **Bhatia R, Lal Ichhpujani R. 2008.** Essentials of medical microbiology. 4ª ed. New Delhi: Jaypee Brothers Medical Publishers: p 224.
13. **Bingen E, Denamur E y Elion J. 1994.** Use of ribotyping in epidemiological surveillance of nosocomial outbreaks. *Clin microbiol rev* 7(3): 311 - 327.
14. **Bingen E, Picard B, Brahimi N, Mathy S, Desjardins P, Elion J y Erick Denamur. 1998.** Phylogenetic analysis of *Escherichia coli* strains causing neonatal meningitis suggests horizontal gene transfer from a predominant pool of highly virulent B2 group strains. *JID* 177: 642 – 50.
15. **Black R. 1990.** Epidemiology of travelers' diarrhea and relative importance of various pathogens. *Rev Infect Dis* 12 (1) 73 - 79.
16. **Blanco M, Blanco J E, Mora A, Dahbi G, Alonso M, González E, Bernárdez M, y Blanco J. 2004.** Serotypes, virulence genes, and intimin types of Shiga toxin (Verotoxin)-producing *Escherichia coli* isolates from cattle in Spain and identification of a new intimin variant gene (eae-ξ). *JMC.* 42(2): 645 - 651.
17. **Blattner F, Plunkett G, Bloch C, Perna N, Burland V, Riley M, Collado-Vides J, Glasner J, Rode C, Mayew C, Gregor J, Davis N, Kirkpatrick H, Goeden M, Rose D, Mau B y Shao Y. 1997.** The complete genome sequence of *Escherichia coli* K-12. *Science* 277: 1453 - 1461.

18. **Blum G, Ott M, Lischewski A, Ritter A, Imrich H, Tschape H y Hacker J. 1994.** Excision of large DNA regions termed pathogenicity islands from tRNA-specific loci in the chromosome of an *Escherichia coli* wild-type pathogen. *Infect Immun* 62: 606 - 614.
19. **Bolivar A, Rojas A, Garcia-Lugo P. 2014.** PCR y PCR – Múltiple: parámetros críticos y protocolos de estatización. *Avances en biomedicina* 3(1): 25 - 33.
20. **Bonacorsi S, Clermont O, Tinsley C, Gall I, Beaudoin J, Elion J, Nassif X y Bingen E. 2000.** Identification of regions of the *Escherichia coli* chromosome specific for neonatal meningitis-associated strains. *Infection and immunity* 68(4): 2096 - 2101.
21. **Boschi-Pinto C, Velebit L, Shibuya K. 2008.** Estimating child mortality due to diarrhoea in developing countries. *Bull World Health Organ.* 86(9): 710 - 717.
22. **Boyd E, Hartl D. 1998.** Chromosomal regions specific to pathogenic isolates of *Escherichia coli* have a phylogenetically clustered distribution. *J Bacteriol* 180: 1159 - 1165.
23. **Bravo P, Garnica J, Fowler M. 1997.** Immunoglobulin G concentrations in periparturient llamas, alpacas and their crias. *Small Ruminant Res* 26: 145 - 149.
24. **Broocks G, Carroll K, Butel J, Morse S y Meitzner T. 2013.** Jawetz, Melnick, & Adelberg's Medical Microbiology. 26ª ed. U.S.A.: McGraw-Hill p 229.
25. **Buchholz U, Bernard H, Werber D, Böhmer M, Remschmidt C, Wilking H, Deleré Y, an der Heiden M, Adlhoch C, Dreesman J, Ehlers J, Ethelberg S, Faber M, Frank C, Fricke G, Greiner M, Höhle M, Ivarsson S, Jark U, Kirchner M, Koch J, Krause G, Luber P, Rosner B, Stark K, y Kühne M. 2011.** German outbreak of *Escherichia coli* O104:H4 associated with sprouts. *N Engl J Med* 365 (19): 1763 - 1770.
26. **Buchrieser C, Glaser P, Rusniok C, Nedjari H, d'Hauteville H, Kunst K, Sansonetti P y Parsot C. 2000.** The virulence plasmid pWR100 and the repertoire of proteins secreted by the type III secretion apparatus of *Shigella flexneri*. *Mol Microbiol* 38(4): 760 - 771.
27. **Buchrieser C, Prentice M, Carniel E. 1998.** The 102-kilobase unstable region of *Yersinia pestis* comprises a high-pathogenicity island linked to a pigmentation segment which undergoes internal rearrangement. *J Bacteriol* 180: 2321 - 2329.
28. **Burland V, Shao Y, Perna N, Plunkett G, Sofia H y Blattner F. 1998.** The complete DNA sequence and analysis of the large virulence plasmid of *Escherichia coli* O157:H7. *Nucleic Acids Res* 26: 4196 - 4204.

29. **Bustinza V, Burfening P, Blackwell R. 1988.** Factors affecting survival in young alpacas (*Lama pacos*). J Anim Sci 66: 1139 - 1143.
30. **Bustinza V. 2001.** La alpaca, conocimiento del gran potencial andino. Puno: Univ. Nacional del Altiplano. 343 p.
31. **Canchaya C, Proux C, Fournous G, Bruttin A y Brussow H. 2003.** Prophage genomics. Microbiol Mol Biol 67(2): 238 - 276.
32. **Carlos C, Pires M, Stoppe N, Hachich E, Sato M, Gomes T, Amaral L y Ottoboni L. 2010.** *Escherichia coli* phylogenetic group determination and its application in the identification of the major animal source of fecal contamination. BMC Microbiology 10: 161.
33. **Carrol P, Woodward M, Wray C. 1990.** Detection of LT and ST1 a toxins by latex and EIA test. Vet Rec 127: 335 - 336.
34. **Castellani A, Chalmers A. 1919.** Manual of Tropical Medicine, 3^a ed. Inglaterra: Bailliere, Tindall & Cox p 935.
35. **CDC. 2004.** Diagnosis and management of foodborne illnesses: a primer for physicians and other health care professionals. MMWR 53: 352 - 6.
36. **CDC. 2012.** Multi state food borne outbreak. Disponible en: <http://www.cdc.gov/foodsafety/outbreaks/multistate-outbreaks/outbreaks-list.html>
37. **Cebra C, Mattson D, Baker R, Sonn R y Dearing P. 2003.** Potential pathogens in feces from unweaned llamas and alpacas with diarrhea. J Am Vet Med Assoc. 223: 1806 - 1808.
38. **Cebra C. 2010.** Disorders of the digestive system. En: Cebra C, Anderson D, Tibary A, Van Saun R, Johnson L, eds. Llama and alpaca care : medicine, surgery, reproduction, nutrition, and herd health. 1^a ed. Canada: Elsevier p 477 - 536.
39. **Chang, M, Groseclose S, Zaidi A y Braden C. 2009.** An ecological analysis of sociodemographic factors associated with the incidence of salmonellosis, shigellosis, and *E. coli* O157:H7 infections in US counties. Epidemiol Infect 137(6): 810 - 820.
40. **Chapman P, Siddons C, Zadik P y Jewes L. 1991.** An improved selective medium for the isolation of *Escherichia coli* O157. J Med Microbiol 35(2): 107 - 110.
41. **Chauduri R, Henderson I. 2012.** The evolution of the *Escherichia coli* phylogeny. Infection, Genetics and Evolution 12: 214-226.
42. **Cheasty T, Rowe B. 1983.** Antigenic relationships between the enteroinvasive *Escherichia coli* O antigens O28ac, O112ac, O124, O136, O143, O144, O152, and O164 and *Shigella* O antigens. J Clin Microbiol. 17:681 - 684.

43. **Chen I, Christie P, Dubnau D. 2005.** The ins and outs of DNA transfer in bacteria. *Science* 310(5753): 1456 - 1460.
44. **Cid D, Martín-Espada C, Maturrano L, García A, Luna L y Rosadio R. 2011.** Diarrheagenic *Escherichia coli* strains isolated from neonatal Peruvian alpacas (*Vicugna pacos*) with diarrhea. En: Pérez-Cabal, M, Gutiérrez J, Cervantes I, Alcalde M, eds. *Fibre production in South American camelids and other fibre animals*. 1ª ed. Wageningen: Wageningen academic publishers. p 223 – 228
45. **Cleary J, Lai L, Donnenberg M, Frankel G y Knutton S, 2004.** Enteropathogenic *E. coli* (EPEC) adhesion to intestinal epithelial cells: role of bundle-forming pili (BFP), EspA filaments and intimin. *Microbiology* 150: 527 - 538.
46. **Clermont O, Bonacorsi S, Bingen E. 2000.** Rapid and simple determination of the *Escherichia coli* phylogenetic group. *Appl environ microbiol* 66(10): 4555 - 4558.
47. **Clermont O, Christenson J, Denamur E y Gordon D. 2013.** The Clermont *Escherichia coli* phylo-typing method revisited: improvement of specificity and detection of new phylogroups. *Environ microbiol rep* 5: 58 - 65.
48. **Clermont O, Gordon D, Denamur E. 2015.** A guide to the various phylogenetic classification schemes for *Escherichia coli* and the correspondence among schemes. *Microbiol.* 161: 980 - 988.
49. **Clermont O, Olier M, Hoede C, Diancourt L, Brisse S, Keroudean M, Glodt J, Picard B, Oswald E y Denamur E. 2011.** Animal and human pathogenic *Escherichia coli* strains share common genetic backgrounds. *Infection, genetics and evolution* 11: 654 - 662.
50. **Cobeljić M, Miljković-Selimović B, Paunović-Todosijević D, Velicković Z, Lepsanović Z, Zec N, Savić D, Ilić R, Konstantinović S, Jovanović B y Kostić V. 1996.** Enteroaggregative *Escherichia coli* associated with an outbreak of diarrhoea in a neonatal nursery ward. *Epidemiol Infect* 117: 11 - 16.
51. **Cohen S, Chang A, Boyer H y Helling R. 1973.** Construction of biologically functional bacterial plasmids in vitro. *Proc natl acad sci USA* 70: 3240 - 3244.
52. **Cooper G, Hausman R, 2010.** La célula. 5ª ed. España: Marbán. p 128 - 130.
53. **Corrales L, Angel V, Caicedo D. 2008.** Identificación de *Salmonella* y *Escherichia coli* en manos y guantes de manipuladores en planta de sacrificio y faenado de un municipio de Cundinamarca. *Nova-Publicación científica en ciencias biomédicas* 6: 101 - 212.
54. **Cortés-Ortiz I, Rodríguez G, Moreno E, Tenorio J, Torres B y Montiel E. 2002.**

- Brote causado por *Escherichia coli* en Chalco-México. Salud pública de México 44(4): 297 - 302.
55. **Corvalán A. 2002.** Biología molecular en infectología parte I: desarrollo y metodologías. Rev Chil Infect 19 (1): 14 - 24.
 56. **Dalton C, Mintz E, Wells J, Bopp C y Tauxe R. 1999.** Outbreaks of enterotoxigenic *Escherichia coli* infection in American adults: a clinical and epidemiologic profile. Epidemiol Infect 123(1): 9 - 16.
 57. **Dawson K, Emerson J, Burns J. 1999.** Fifteen years of experience with bacterial meningitis. Pediatr. Infect. Dis. J. 18: 816 - 822.
 58. **De Erice E, Golzález A. 2012.** Biología la ciencia de la vida. 2ª ed. Mexico: McGraw-Hill / Interamericana editores: p 300 - 303.
 59. **DebRoy C, Maddox C. 2001.** Identification of virulence atributes of gastrointestinal *Escherichia coli* isolates of veterinary significance. Anim Health Res Rev 2: 129 - 140.
 60. **Delius H, Worcel A. 1974.** Electron microscopic studies on the folded chromosome of *Escherichia coli*. Cold Spring Harb Symp Quant Biol 38: 53 - 58.
 61. **Desjardins P, Picard B, Kaltenböck B, Elion J y Denamur E. 1995.** Sex in *Escherichia coli* does not disrupt the clonal structure of the population: evidence from random amplified polymorphic dna and restriction-fragment-length polymorphism. J mol evol 41: 400 - 448.
 62. **Devasia R, Jones T, Ward J, Stafford L, Hardin H, Bopp C, Beatty M, Mintz E y Schaffner W. 2006.** Endemically acquired foodborne outbreak of enterotoxin-producing *Escherichia coli* serotype O169:H41. Am J Med 119(2): 168 - 168.
 63. **Dobrindt U, Hochhut B, Hentschel U y Hacker J. 2004.** Genomic islands in pathogenic and environmental microorganisms. Nat Rev Microbiol 2(5): 414 - 424.
 64. **Donnenberg M, Girón J, Nataro J y Kaper J, 1992.** A plasmid-encoded type IV fimbrial gene of enteropathogenic *Escherichia coli* associated with localized adherence. Mol Microbiol 6: 3427 - 3437.
 65. **Donnenberg M. 2013.** *Escherichia coli* pathotypes and principles of pathogenesis. 2ª ed. Baltimore: Elsevier p 571.
 66. **Dorman C. 2013.** Genome architecture and global gene regulation in bacteria: making progress towards a unified model?. Nat Rev Microbiol 11:349 - 355.
 67. **Doumith M, Dhanji H, Ellington M, Hawkey P y Woodford N. 2012.** Characterization of plasmids encoding extended-spectrum beta-lactamases and their

- addiction systems circulating among *Escherichia coli* clinical isolates in the UK. J antimicrob chemother 67: 878 - 885.
68. **Dudley E, Abe C, Ghigo J-M, Latour-Lambert P, Hormazabal J y Nataro J. 2006.** An IncII plasmid contributes to the adherence of the atypical enteroaggregative *Escherichia coli* strain C1096 to cultured cells and abiotic surfaces. Infect Immun. 74: 2102 - 2114.
 69. **Duriez P, Clermont O, Bonacorsi S, Bingen E, Chaventré A, Elion J, Picard P y Denamur E. 2001.** Commensal *Escherichia coli* isolates are phylogenetically distributed among geographically distinct human populations. Microbiology 147: 1671 - 1676.
 70. **Elnifro E, Ashshi A, Cooper R y Klapper E. 2000.** Multiplex PCR: Optimization and application in diagnostic virology. Clin microbiol rev 13(4): 559 - 570.
 71. **Enright M, Spratt B. 1999.** Multilocus sequence typing. Trends Microbiol 7: 482 - 487.
 72. **Erickson M, Doyle M. 2007.** Food as a vehicle for transmission of Shiga toxin-producing *Escherichia coli*. J Food Prot 70: 2426 - 49.
 73. **Erlich A. 1989.** Polymerase Chain Reaction. Journal of clinical immunology 9(6): 437.
 74. **Escobar-Páramo P, Clermont O, Blanc-Potard A, Bui H, Le Bouguénec Ch y Denamur E. 2004.** A specific Genetic Background Is Required for Acquisition and Expression of Virulence Factors in *Escherichia coli*. Molecular Biology and Evolution 21(6): 1085 - 1094.
 75. **Escobar-Páramo, P, Clermont O, Blanc-Potard A, Bui H, Le Bouguénec C y Denamur E. 2006.** A specific genetic background is required for acquisition and expression of virulence factors in *Escherichia coli*. Mol Biol Evol 21: 1085 - 1094.
 76. **Eslava C, Navarro-García F, Czczulin J, Henderson I, Cravioto A, Nataro J. 1998.** Pet, an autotransporter enterotoxin from enteroaggregative *Escherichia coli*. Infect Immun 66: 3155 - 3163.
 77. **Espéli O, Boccard F. 2006.** Organization of the *Escherichia coli* chromosome into macrodomains and its possible functional implications. J Struct Biol 156: 304 - 310.
 78. **Espéli O, Mercier R, Boccard F. 2008.** DNA dynamics vary according to macrodomain topography in the *E. coli* chromosome. Mol Microbiol 68: 1418 - 1427.
 79. **Falkow S. 1975.** Infectious multiple drug resistance. Pion, London-United Kingdom.
 80. **Feil E, Spratt B. 2001.** Recombination and the population structures of bacterial pathogens. Annu Rev Microbiol 55: 561 - 590.

81. **Fernández Baca, S. 2005.** Situación actual de los camélidos sudamericanos en Perú. Proyecto de Cooperación Técnica en apoyo de la crianza y aprovechamiento de los Camélidos Sudamericanos en la Región Andina TCP/RLA/2914. Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación (FAO).
82. **Foster A, Otter A, Barlow A, Pearson G, Woodward M, Higgins R. 2008.** Naturally occurring intestinal lesions in three alpacas (*Vicugna pacos*) caused by attaching and effacing *Escherichia coli*. Vet Rec. 162: 318 - 320.
83. **Foxman B. 2003.** Epidemiology of urinary tract infections: incidence, morbidity, and economic costs. Dis Mon 49 (2): 53 - 70.
84. **Froehlich B, Karakashian A, Melsen R, Wakefield J y Scott J. 1994.** CooC and CooD are required for assembly of CS1 pili. Mol Microbiol 12: 387 - 401.
85. **Froehlich B, Parkhill J, Sanders M, Quail M, y Scott J. 2005.** The pCoo plasmid of enterotoxigenic *Escherichia coli* is a mosaic Cointegrate. J Bacteriol 187(18): 6509 - 6516.
86. **Funnell B, Phillips G. 2004.** Plasmid biology. 1ª ed. Washington DC. ASM p 614
87. **Gaillard M, gVallaeyts T, Vorhölter F, Minoia M, Werlen C, Sentchilo V, Pühler A y van der Meer J. 2006.** The clc element of *Pseudomonas* sp. strain B13, a genomic island with various catabolic properties. J Bacteriol 188: 1999 - 2013.
88. **Gal-Mor O, Finlay B. 2006.** Pathogenicity islands: a molecular toolbox for bacterial virulence. Cell Microbiol 8: 1707 - 1719.
89. **Garmendia A, Palmer G , De Martín J y McGuire T. 1987.** Failure of passive immunoglobulin transfer: a major determinant of mortality in newborn alpacas (*L.pacos*). Am J Vet Res 48(10): 1472 - 1476.
90. **Giron J, Ho A, Schoolnik G.1991.** An inducible bundle-forming pilus of enteropathogenic *Escherichia coli*. Science 254: 710 - 713.
91. **Gladstone I, Ehrenkranz R, Edberg S y Baltimore R. 1990.** A ten-year review of neonatal sepsis and comparison with the previous fifty-year experience. Pediatr Infect Dis 9: 819 - 825.
92. **González J, Delfín H, de la Cruz M, Rojas R, Zamudio M. 2011.** Protocolo para la extracción de ADN metagenómico bacteriano del langostino *Macrobrachium carcinus* L. Tropical and subtropical agroecosystems 14: 875 - 883.
93. **Gordon D, Cowling A. 2003.** The distribution and genetic structure of *Escherichia coli* in Australian vertebrates: host and geographic effects. Microbiology 149: 3575-3586

94. **Gordon D, Clermont O, Tolley H y Denamur E. 2008.** Assigning *Escherichia coli* strains to phylogenetic groups: multi-locus sequence typing versus the PCR triplex method. *Environ Microbiol* 10: 2484 - 2496.
95. **Gordon D, Stern S, Collignon P. 2005.** Influence of the age and sex of human hosts on the distribution of *Escherichia coli* ECOR groups and virulence traits. *Microbiology* 151: 15 - 23.
96. **Gordon D. 2004.** The influence of ecological factors on the distribution and genetic structure of *Escherichia coli*. In *Escherichia Coli and Salmonella Typhimurium: Cellular and Molecular Biology*. Neidhardt, F., *et al.* eds. Washington, DC, USA: American Society for Microbiology.
97. **Goulet P, Picard B. 1986.** Comparative esterase electrophoretic polymorphism of *Escherichia coli* isolates obtained from animal and human sources. *J Gen Microbiol* 132: 1843 - 1851.
98. **Grohmann E, Muth G, Espinosa M. 2003.** Conjugative plasmid transfer in gram-positive bacteria. *Microbiol Mol Biol Rev* 67(2): 277 – 301.
99. **Hacker J, Carniel E. 2001.** Ecological fitness, genomic islands and bacterial pathogenicity. *EMBO reports* 2(5): 376 – 381.
100. **Hacker J, Kaper J. 2000.** Pathogenicity islands and the evolution of microbes. *Annu Rev Microbiol* 54: 641 - 679.
101. **Hacker J, Bender L, Ott M, Wingender J, Lund B, Marre R y Goebel W. 1990.** Deletions of chromosomal regions coding for fimbriae and hemolysins occur *in vitro* and *in vivo* in various extraintestinal *Escherichia coli* isolates. *Microb Pathog* 8: 213 - 225.
102. **Hacker J, Blum-Oehler G, Muhlendorfer I and Tschäpe H. 1997.** Pathogenicity island of virulent bacteria: Structure, function and impact on microbial evolution. *Mol Microbiol* 23: 1089 - 1097.
103. **Hacker J, Knapp S, Goebel W. 1983.** Spontaneous deletions and flanking regions of the chromosomal inherited hemolysin determinant of an *Escherichia coli* O6 strain. *J Bacteriol* 154: 1145 - 52.
104. **Hacker J, Ott M, Blum G, Marre R, Heesemann J, Tschäpe H y Goebel E. 1992.** Genetics of *Escherichia coli* uropathogenicity: analysis of the O6:K15:H31 isolate 536. *Zentralbl Bakteriologie* 276, 165 - 175.
105. **Hannah E, Johnson J, Angulo F, Haddadin B, Williamson J y Samore M. 2009.** Molecular analysis of antimicrobial-susceptible and-resistant *Escherichia coli* from

- retail meats and human stool and clinical specimens in a rural community setting. Foodborne pathogens and disease 6(3): 285 - 295.
106. **Hawkey P. 2008.** The growing burden of antimicrobial resistance. J Antimicrob Chemother 62 (1): 1 - 9.
 107. **Hernández Y, Lobo E, Martínez S y Zamora L. 2009.** Evaluación de diferentes métodos de extracción de ADN de micoplasmas para su empleo en el diagnóstico por PCR. Rev salud anim 31(2): 108 - 114.
 108. **Herzer P, Inouye S, Inouye M y Whittam T. 1990.** Phylogenetic distribution of branched RNA-linked multicopy single-stranded DNA among natural isolates of *Escherichia coli*. J bacteriol. 172(11): 6175 - 6181.
 109. **Higgins J, Hohn C, Hornor S, Franad M, Denvere M y Joerger R. 2007.** Genotyping of *Escherichia coli* from environmental and animal samples. J microbiol methods 70: 227 - 235.
 110. **Huang D, Koo H, DuPont H. 2004.** Enterotoxigenic *Escherichia coli*: an emerging pathogen. Curr Infect Dis Rep 6(2): 83 - 86.
 111. **Innis M, Myambo K, Gelfand D y Brow M. 1988.** DNA sequencing with *Thermus aquaticus* DNA polymerase, and direct sequencing of PCR-amplified DNA. Proc Natl Acad Sci U.S.A. 85: 9436 - 9440.
 112. **Itoh Y, Nagano I, Kunishima M y Ezaki T. 1997.** Laboratory investigation of enterotoxigenic *Escherichia coli* O untypeable:H10 associated with a massive outbreak of gastrointestinal illness. J Clin Microbiol 35(10): 2546 - 2550.
 113. **Jacob F, Brenner S. 1963.** On the regulation of DNA synthesis in bacteria: the hypothesis of the replicon. C R Hebd. seances acad sci 256: 298 - 300.
 114. **Jauregui F, Landraud L, Passet V, Diancourt L, Frapy E, Guigon G, Carbonnelle E, Lortholary O, Clermont O, Denamur E, Picard B, Nassif X y Brisse S. 2008.** Phylogenetic and genomic diversity of human bacteremic *Escherichia coli* strains. BMC Genomics 9: 560.
 115. **Johnson J, Russo T. 2002.** Extraintestinal pathogenic *Escherichia coli*: “the other bad *E. coli*”. J. Lab Clin Med. 139: 155–162.
 116. **Johnson J, Stell A. 2000.** Extended virulence genotypes of *Escherichia coli* strains from patients with urosepsis in relation to phylogeny and host compromise. J Infect Dis 181(1): 261 - 272.

117. **Johnson J, Stell A. 2000.** Extended virulence genotypes of *Escherichia coli* strains from patients with urosepsis in relation to phylogeny and host compromise. *J Infect Dis* 181: 261 - 272.
118. **Johnson J, Delavari P, Kuskowski M y Stell A. 2001.** Phylogenetic distribution of extraintestinal virulence-associated traits in *Escherichia coli*. *JID* 183: 78-88.
119. **Johnson J. 1991.** Virulence factors in *Escherichia coli* urinary tract infection. *Clin Microbiol Rev* 4 (1): 80 - 128.
120. **Juhas M, van der Meer J, Gaillard M, Harding R, Hood D y Crook D. 2009.** Genomic islands: tools of bacterial horizontal gene transfer and evolution. *FEMS Microbiol* 33: 376 - 393.
121. **Kaper J, Nataro, Mobley H. 2004.** Pathogenic *Escherichia coli*. *Nat rev microbiol* 2: 123-140.
122. **Karama M, Gyles C. 2010.** Methods for genotyping Verotoxin-producing *Escherichia coli*. *Zoonoses Public Hlth* 57(7 - 8): 447.
123. **Kauffmann F. 1947.** The serology of the coli group. *J Immunol* 57: 71 – 100.
124. **Kim K. 2001.** *E. coli* translocation at the blood–brain barrier. *Infect Immun* 69: 5217 - 5222.
125. **Kim K. 2002.** Strategy of *E. coli* for crossing the blood-brain barrier. *J Infect Dis* 186: S220 - S224.
126. **Kim K. 2003.** Neurological diseases: pathogenesis of bacterial meningitis: from bacteremia to neuronal injury. *Nat Rev Neurosci* 4: 376 - 385.
127. **Kim K. 2008.** Mechanisms of microbial traversal of the blood-brain barrier. *Nat Rev Microbiol* 6: 625 - 634.
128. **Kim K. 2010.** Acute bacterial meningitis in infants and children. *Lancet Infect Dis* 10: 32 - 42.
129. **Kim K. 2012.** Current concepts on the pathogenesis of *E. coli* meningitis; implications for prevention and therapy. *Curr Opin Infect Dis* 25: 273 - 278.
130. **Klinger G, Chin C-N, Beyene J y Perlman, M. 2000.** Predicting the outcome of neonatal bacterial meningitis. *Pediatrics* 106: 477 - 482.
131. **Kodner C, Thomas Gupton E, 2010.** Recurrent urinary tract infections in women: diagnosis and management. *Am Fam Physician* 82(6): 638 - 643.
132. **Kosek M, Bern C, Guerrant R. 2003.** The global burden of diarrhoeal disease, as estimated from studies published between 1992 and 2000. *Bull World Health Organ*

81(3): 197 - 204.

133. **Krause D, Little A, Dowd S y Bernstein C. 2011.** Complete genome sequence of adherent invasive *Escherichia coli* UM146 isolated from Ileal Crohn's disease biopsy tissue. J bacteriol. 193: 583.
134. **Kugelberg, Kofoed E, Reams A, Andersson D y Roth J. 2006.** Multiple pathways of selected gene amplification during adaptive mutation. Proc Natl Acad Sci USA 103(46): 17319 - 17324.
135. **Larbig K, Christmann A, Johann A, Klockgether J, Hartsch T, Merkl R, Wiehlmann L, Fritz H y Tümmler B. 2002.** Gene islands integrated into tRNA(Gly) genes confer genome diversity on a *Pseudomonas aeruginosa* clone. J Bacteriol 184: 6665 - 6680.
136. **Lecointre G, Rachdi L, Darlu P y Denamur E. 1998.** *Escherichia coli* molecular phylogeny using the incongruence length difference test. Mol biol evol. 15(12): 1685–1695.
137. **Lederberg J, Tatum E. 1953.** Sex in bacteria; genetic studies, 1945–1952. Science 118: 169-175.
138. **Lederberg J, Tatum E. 1953.** Sex in bacteria: Genetic studies: 1945 - 1952. Science 118: 169 -175.
139. **Lee J, Hiibel S, Reardon K y Wood T. 2009.** Identification of stress-related proteins in *Escherichia coli* using the pollutant cis-dichloroethylene. J Appl Microbiol 108(2010): 2088 - 2102.
140. **Li B, Sun J, Han L, Huang X, Fu Q y Ni Y. 2010.** Phylogenetic groups and pathogenicity island markers in fecal *Escherichia coli* isolates from asymptomatic humans in China. Appl Environ Microbiol 76: 6698 - 6700.
141. **Li W, Raoult D, Forunier P. 2009. Bacterial strain typing in the genomic era.** FEMS Microbiol Rev 33(5): 892 - 916.
142. **Li Y, Cao B, Liu B, Liu D, Gao Q, Peng X, Wu J, Bastin D, Feng L y Wang L. 2009.** Molecular detection of all 34 distinct O-antigen forms of *Shigella*. J Med Microbiol 58: 69 – 81.
143. **Lim J, Yoon J, Hovde C. 2010.** A brief overview of *Escherichia coli* O157:H7 and its plasmid O157. Microbiol Biotechnol January 20(1): 5 - 14.
144. **Liu D. 2010.** Molecular detección of foodborne pathogens. 1ª ed. U.S.A.: CRC.p 3.

145. **Lopez E, Contrini M, Devoto S, De Rosa M, Graña M, Aversa L, Gomez H, Genero M y Cleary T. 1995.** Incomplete hemolytic-uremic syndrome in Argentinean children with bloody diarrhea. *J Pediatr* 127 (3): 364 - 367.
146. **López W, Chamorro M, Garmendia A. 2011.** Detección rápida de rotavirus y coronavirus en crías de alpaca (*Vicugna pacos*) con diarrea en la región del Cusco, Perú. *Rev Vet Perú* 22 (4): 407 - 411.
147. **Low D, David V, Lark D, Schoolnik G y Falkow S. 1984.** Gene clusters governing the production of hemolysin and mannose-resistant hemagglutination are closely linked in *Escherichia coli* serotype O4 and O6 isolates from urinary tract infections. *Infect Immun.* 43: 353 – 58.
148. **Luna L, Maturrano L, Rivera H, Zanabria V y Rosadio R. 2012.** Genotipificación, evaluación toxigénica in vitro y sensibilidad a antibióticos de cepas de *Escherichia coli* aisladas de casos diarreicos y fatales en alpacas neonatas. *Rev Inv Vet Perú* 23(3): 280 – 288.
149. **Madigan M, Martinko J, Stahl D y Clark D. 2011.** Brock Biology of microorganisms. 13ª ed. U.S.A.: Benjamins Cummings p 169, 170.
150. **Maiden M, Bygraves J, Feil E, Morelli G, Russell J, Urwin R, Zhang Q, Zhou J, Zurth K, Caugant D, Feavers I, Achtman M y Spratt B. 1998.** Multilocus sequence typing: a portable approach to the identification of clones within populations of pathogenic microorganisms. *Proc Natl Acad Sci USA* 95: 3140 - 3145.
151. **Manning S. 2010.** *Escherichia coli* infections. 2ª ed. U.S.A.: Chelsea house p 135.
152. **Martinez-Medina M, Aldeguez X, Lopez-Siles M, González-Huix F, López-Oliu C, Dahbi G, Blanco JE, Blanco J, Garcia-Gil LJ y Darfeuille-Michaud A. 2009.** Molecular diversity of *Escherichia coli* in the human gut: new ecological evidence supporting the role of adherent-invasive *E. coli* (AIEC) in Crohn's disease. *Inflamm Bowel Dis.* 15: 872– 882.
153. **Mayer H, Wanke C, Du B, Hammer S y Terwilliger E. 1995.** HIV-1 Tat modulates invasion by a bacterial enteric pathogen into a human intestinal cell line. *AIDS* 9 (11): 1237 - 1242.
154. **McDaniel T, Jarvis, K, Donnenberg, M y Kaper, J. 1995.** A genetic locus of enterocyte effacement conserved among diverse enterobacterial pathogens. *Proc Natl Acad Sci USA* 92: 1664 - 1 668.
155. **Mellmann A, Bielaszewska M y Karch, H. 2009.** Intrahost genome alterations in enterohemorrhagic *Escherichia coli*. *Gastroenterology* 136(6): 1925 - 1938.

156. **Messerschmidt S, Waldminghaus T. 2014.** Dynamic organization: Chromosome domains in *Escherichia coli*. J Mol Microbiol Biotechnol 24: 301–315.
157. **Milkman R. 1973.** Electrophoretic variation in *Escherichia coli* from natural sources. Science 182: 1024 - 1026.
158. **Miquel S, Peyretailade E, Claret L, de Vallée A, Dossat C, Vacherie B, Zineb E, Segurens B, Barbe V, Sauvanet P, Neut C, Colombel J-F, Medigue C, Mojica F, Peyret P, Bonnet R y Darfeuille-Michaud A. 2010.** Complete genome sequence of Crohn's disease-associated adherent-invasive *E. coli* strain LF82. Plos one 5(9): 12714.
159. **Morales S, Paredes D, Pezo D. 2007.** Asociación de rotavirus y *Escherichia coli* fimbriada como agentes causales de infecciones entéricas en alpacas neonatas. Rev Inv Vet Perú 18(2): 150 - 153.
160. **Moran N, Plague G, 2004.** Genomic changes following host restriction in bacteria. Curr Opin Genet Dev 14(6): 627 - 633.
161. **Moro M. 1965.** Enfermedades infecciosas de las alpacas y ovinos observados en el Perú. Bol Div IVITA, Lima 4: 12 – 13
162. **Mühldorfer I, Hacker J. 1994.** Genetic aspects of *Escherichia coli* virulence. Microb Pathog 16: 171 - 181.
163. **Nataro J, Kaper J. 1998.** Diarrheagenic *Escherichia coli*. Clin Microbiol Rev. 11: 142 - 201.
164. **Nataro J, Kaper J, Robins-Browne R, Prado V, Vial P y Levine M. 1987.** Patterns of adherence of diarrheagenic *Escherichia coli* to HEp-2 cells. Pediatr Infect Dis J. 6: 829 - 831.
165. **Nataro J, Scaletsky I, Kaper J, Levine M y Trabulsi L. 1985.** Plasmid-mediated factors conferring diffuse and localized adherence of enteropathogenic *Escherichia coli*. Infect. Immun. 48:378 - 383.
166. **Nicolle L. 2005.** Catheter-related urinary tract infection. Drugs Aging 22 (8): 627 - 639.
167. **Niki H, Yamaichi Y, Hiraga S. 2000.** Dynamic organization of chromosomal DNA in *Escherichia coli*. Genes Dev 14: 212 - 223.
168. **Nowrouzian F, Adlerberth I, Wold A. 2006.** Enhanced persistence in the colonic microbiota of *Escherichia coli* strains belonging to phylogenetic group B2: role of virulence factors and adherence to colonic cells. Microbes infect 8: 834 - 840.

169. **Nowrouzian F, Ostblom A, Wold A y Adlerberth I. 2009.** Phylogenetic group B2 *Escherichia coli* strains from the bowel microbiota of Pakistani infants carry few virulence genes and lack the capacity for long-term persistence. Clin Microbiol Infect 15: 466 – 472.
170. **Nowrouzian F, Ostblom A, Wold A y Adlerberth I. 2009.** Phylogenetic group B2 *Escherichia coli* strains from the bowel microbiota of Pakistani infants carry few virulence genes and lack the capacity for long-term persistence. Clin Microbiol Infect 15: 466 - 472.
171. **O'Brien C, Gordon D. 2011.** Effect of diet and gut dynamics on the establishment and persistence of *Escherichia coli*. Microbiology 157: 1375 - 1384.
172. **O'sullivan J, Bolton D, Duffy G, Baylis C, Tozzoli C, Wasteson Y y Lofdahl S. 2007.** Methods for detection and molecular characterization of pathogenic *Escherichia coli*. Pathogenic *Escherichia coli* Network. Teagasc, Ashtow Food Research Centre, Dublin.
173. **Ochman H, Selander R. 1984.** Standard reference strains of *Escherichia coli* from natural populations. J bacteriol 157(2): 690 - 693.
174. **Ochman H, Selander R. 1984a.** Evidence for clonal population structure in *Escherichia coli*. Proc Natl Acad Sci USA 81: 198 - 201.
175. **Ochman H, Lawrence J, Groisman E. 2000.** Lateral gene transfer and the nature of bacterial innovation. Nature 405(6784): 299 - 304.
176. **Okeke I, Nataro J. 2001.** Enteropathogenic *Escherichia coli*. Lancet Infect. Dis. 1 (5): 304 - 313.
177. **Orsi R, Stoppe N, Sato M, Ottoboni L. 2007.** Identification of *Escherichia coli* from groups A, B1, B2 and D in drinking water in Brazil. J water Health 5: 323 - 327.
178. **Orskov F, Orskov I. 1984.** Serotyping of *Escherichia coli*. En: Bergan T, ed. Methods in Microbiology. p 43–112.
179. **Oshima K, Toh H, Ogura Y, Sasamoto H, Morita H, Park S, Ooka T, Iyoda S, Taylor T, Hayashi T, Itoh K y Hattori M. 2008.** Complete genome sequence and comparative analysis of the wild-type commensal *Escherichia coli* strain SE11 isolated from a healthy adult. DNA research 15: 375 - 386.
180. **Palacios C, Perales R, Chavera A y Lopez U. 2005** Caracterización anatómo-histopatológica de enteropatías causantes de mortalidad en crías de alpaca. Rev investig vet Perú 16(1): 34 - 40.

181. **Pallecchi L, Lucchetti C, Bartoloni A, Bartalesi F, Mantella A, Gamboa H, Carattoli A, Paradisi F y Rossolini G. 2007.** Population structure and resistance genes in antibiotic-resistant bacteria from a remote community with minimal antibiotic exposure. *Antimicrob Agents Chemother* 51: 1179 - 1184.
182. **Pearson H. 2007.** The dark side of *E. coli*. *Nature* 445: 8 - 9.
183. **Postow L, Hardy C, Arsuaga J y Cozzarelli N. 2004.** Topological domain structure of the *Escherichia coli* chromosome. *Genes Dev* 18: 1766 - 1779.
184. **Power M, Littlefield-Wyer J, Gordon D, Veal D, Slade M. 2005.** Phenotypic and genotypic characterization of encapsulated *Escherichia coli* isolated from blooms in two Australian lakes. *Environ Microbiol* 7: 631 - 640.
185. **Quim P, Carter M, Markey B y Carter R. 1993.** Clinical veterinary microbiology. 1ª ed. London: Mosby 209 – 236.
186. **Quim P, Markey B, Leonard F, FitzPatrick E, Fanning S y Hartigan P. 2011.** Veterinary microbiology and microbial disease. 2ª ed. U.K.: Wiley-Blackwell p 349 - 359.
187. **Rangel J, Sparling P, Crowe C, Griffin P y Swerdlow D. 2005.** Epidemiology of *Escherichia coli* O157:H7 outbreaks, United States, 1982-2002. *Emerg Infect Dis* 11: 603-609.
188. **Rasko D, Webster D, Sahl J, Bashir A, Boisen N, Scheutz F, Peluso P, Lee L, Kislyuk A, Bullard J, Kasarskis A, Wang S, Eid J, Rank D, Redman J, Steyert S, Frimodt-Møller J, Struve C, Petersen A, Krogfelt K, Nataro J, Schadt E y Waldor M. 2011.** Origins of the *E. coli* strain causing an outbreak of hemolytic-uremic syndrome in Germany. *N Engl J Med* 365(8): 709 - 717.
189. **Reyes-Lamothe R, Wang X, Sherratt D. 2008.** *Escherichia coli* and its chromosome. *Trends Microbiol* 16 (5): 238 - 245.
190. **Rivas L, Mellor G, Gobius K y Fegan N. 2015.** Detection and typing strategies for pathogenic *Escherichia coli*. 1ª ed. Madison: Springer p 67 – 90.
191. **Ronald A. 2002.** The etiology of urinary tract infection: traditional and emerging pathogens. *Am J Med* 113 (Supl. 1A): 14S - 19S.
192. **Rosadio R, Ameghino E. 1994.** Coccidial infections in neonatal Peruvian alpacas. *Vet Rec* 135: 459 - 460.
193. **Rosadio R, Maturrano L, Pérez D y Luna L. 2012.** El complejo entérico neonatal en alpacas andinas. *Rev Inv Vet Perú* 23(3): 261 – 271.
194. **Rosenberg M, Koplan J, Wachsmuth I, Wells J, Gangarosa E, Guerrant R y**

- Sack S. 1977.** Epidemic diarrhea at Crater Lake from enterotoxigenic *Escherichia coli*. A large waterborne outbreak. *Ann Intern Med* 86(6): 714 – 718
- 195.**Rulofson F, Atwill E, Holmberg C. 2001.** Fecal shedding of *Giardia duodenalis*, *Cryptosporidium parvum*, *Salmonella* organisms, and *Escherichia coli* O157:H7 from llamas in California. *Am J Vet Res.* 62: 637 - 642.
- 196.**Russo T, Johnson J, 2000.** Proposal for a new inclusive designation for extraintestinal pathogenic isolates of *Escherichia coli*: ExPEC. *J Infect Dis.* 181: 1753–1754.
- 197.**Ryan K, George Ray C. 2011.** Sherris microbiología médica. 5ª ed. Mexico D.F.: McGraw-Hill: p 260.
- 198.**Sabat A, Budimir A, Nashev D, Sa-Leao R, van Dijn J, Laurent F, Grundmann H y Friedrich A. 2013.** Overview of molecular typing methods for outbreak detection and epidemiological surveillance. *Euro surveill* 18(4): 17 – 30.
- 199.**Sack D, Huda S, Neogi P, Daniel R y Spira W. 1980.** Microtiter ganglioside enzyme-linked immunosorbent assay for vibrio and *Escherichia coli* heat-labile enterotoxins and antitoxin. *J Clin Microbiol.* 11(1): 35 - 40.
- 200.**Sack R. 1990.** Travelers' diarrhea: microbiologic bases for prevention and treatment. *Rev Infect Dis* 12 (1): 59 - 63.
- 201.**Salazar A, Sandoval A, Armendáriz J. 2013.** Biología molecular, fundamentos y aplicaciones en ciencias de la salud. 1ª ed. Mexico D.F.: McGraw hill p 145-159.
- 202.**Sartor R, 2005.** Does *Mycobacterium avium* subspecies paratuberculosis cause Crohn's disease? *Gut* 54: 896 - 898.
- 203.**Scaletsky I, Silva M, Trabulsi L. 1984.** Distinctive patterns of adherence of enteropathogenic *Escherichia coli* to HeLa cells. *Infect Immun.* 45: 534–536.
- 204.**Scallan E, Hoekstra R, Angulo F, Tauxe R, Widdowson M, Roy S, Jones J y Griffin P. 2011.** Foodborne illness acquired in the United States-major pathogens. *Emerg Infect Dis* 17(1): 7 - 15.
- 205.**Schappert S, Rechtsteiner E . 2008.** Ambulatory medical care utilization estimates for 2006. *Natl Health Stat Rep* (8): 1 - 29.
- 206.**Schmidt H, Hensel M. 2004.** Pathogenicity islands in bacterial pathogenesis. *Clin Microbiol Rev* 17: 14 - 56.
- 207.**Schmidt H, Beutin L, Karch H. 1995.** Molecular analysis of the plasmid-encoded hemolysin of *Escherichia coli* O157:H7 strain EDL 933. *Infect Immun* 63(3): 1055 – 1061.

208. **Selander R, Levin B. 1980.** Genetic diversity and structure in *Escherichia coli* populations. *Science* 210: 545 - 547.
209. **Selander R, Caugant D, Ochman, Mussser J, Gilmour M, y Whittam T. 1986.** Methods of multilocus enzyme electrophoresis for bacterial population genetics and systematics. *Appl Environ Microbiol* 51:873–884.
210. **Servin A, 2005.** Pathogenesis of Afa/Dr diffusely adhering *Escherichia coli*. *Clin microbiol rev* 18 :264 –292.
211. **Silvera E, Perales R, Rodríguez J, López T, Gavidia C, Agapito J y Palacios C. 2012.** Presencia de *Escherichia coli* O157 en crías de alpacas (*Vicugna pacos*). *Rev Inv Vet Perú* 23(1): 98 – 104.
212. **Sjoling A, Wiklund G, Savarino S, Cohen D y Svennerholm A. 2007.** Comparative analyses of phenotypic and genotypic methods for detection of enterotoxigenic *Escherichia coli* toxins and colonization factors. *J Clin Microbiol* 45(10): 3295 - 3301.
213. **Skurnik D, Bonnet D, Bernède-Bauduin C, Michel R, Guette C, Becker J, Balaire C, Chau F, Mohler J, Jarlier V, Boutin J, Moreau B, Guillemot D, Denamur E, Andremont A y Ruimy R. 2008.** Characteristics of human intestinal *Escherichia coli* with changing environments. *Environ Microbiol* 10: 2132 - 2137.
214. **Skurnik D, Ruimy R, Andremont A, Amorin C, Rouquet P, Picard B y Denamur E. 2006.** Effect of human vicinity on antimicrobial resistance and integrons in animal faecal *Escherichia coli*. *J Antimicrob Chemother* 57: 1215 -1219.
215. **Smith H, Linggood M. 1971.** Observations on the pathogenic properties of the K88, Hly and Ent plasmids of *Escherichia coli* with particular reference to porcine diarrhoea. *J Med Microbiol* 4: 467 - 485.
216. **Sorensen S, Bailey M, Hansen L, Kroer N y Wuertz, S. 2005.** Studying plasmid horizontal transfer in situ: a critical review. *Nat Rev Microbiol* 3(9): 700 - 710.
217. **Souza V, Rocha M, Valera A y Eguiarte L. 1999.** Genetic structure of natural populations of *Escherichia coli* in wild hosts on different continents. *Appl Environ Microbiol* 65: 3373 – 3385.
218. **Stamm W, Hooton T. 1993.** Management of urinary tract infections in adults. *N Engl J Med* 329 (18): 1328 - 1334.
219. **Starr C, Taggart R, Evers C y Starr L. 2009.** Biología: La unidad y la diversidad de la vida. 12ª ed. México: Cengage Learning p 907.
220. **Stevens J, Eames M, Kent A, Halket S, Holt D y Harvey D. 2003.** Long term outcome of neonatal meningitis. *Arch Dis Child Fetal Neonatal* Ed 88: 179 - 184.

221. **Subekti D, Lesmana M, Tjaniadi P, Machpud N, Sriwati, Sukarma, Daniel J, Alexander W, Campbell J, Corwin A, Beecham H, Simanjuntak C y Oyoyo B. 2003.** Prevalence of enterotoxigenic *Escherichia coli* (ETEC) in hospitalized acute diarrhea patients in Denpasar, Bali, Indonesia. *Diagn Microbiol Infect Dis* 47(2): 399 - 405.
222. **Sullivan J, Trzebiatowski J, Cruickshank R, Gouzy J, Brown S, Elliot R, Fleetwood D, McCallum N, Rossbach U, Stuart G, Weaver J, Webby R, De Bruijn F y Ronson C. 2002.** Comparative sequence analysis of the symbiosis island of *Mesorhizobium loti* strain R7A. *J Bacteriol* 184: 3086 - 3095.
223. **Swenson D, Bukanov N, Berg D y Welch, R. 1996.** Two pathogenicity islands in uropathogenic *Escherichia coli* J96: cosmid cloning and sample sequencing. *Infect Immun* 64: 3736 - 3743.
224. **Tarr P, Gordon C, Chandler W. 2005.** Shiga-toxin-producing *Escherichia coli* and haemolytic uraemic syndrome. *Lancet* 365 (9464): 1073 - 1086.
225. **Tatum E, Lederberg J. 1947.** Gene recombination in the bacterium *Escherichia coli*. *J bacteriol* 53: 673-684.
226. **Tenaillon O, Skurnik D, Picard B y Denamur E. 2010.** The population genetics of commensal *Escherichia coli*. *Nat Rev Microbiol* 8: 207 - 217.
227. **Thompson M, Jordan R, Luttrell M, Brandwein H, Kaper, J, Levine M y Giannella R. 1986.** Blinded, two-laboratory comparative analysis of *Escherichia coli* heat-stable enterotoxin production by using monoclonal antibody enzyme-linked immunosorbent assay, radioimmunoassay, suckling mouse assay, and gene probes. *J Clin Microbiol* 24(5): 753 - 758.
228. **Thorns C, Sojka M, Roeder P. 1989.** Detection of fimbrial adhesins of ETEC using monoclonal antibodybased latex reagents. *Vet Rec* 125: 91 – 92.
229. **Tibary A, Johnson L, Pearson L y Rodriguez J. 2010.** Lactation and neonatal care. En: Cebra C, Anderson D, Tibary A, Van Saun R, Johnson L, eds. *Llama and alpaca care : medicine, surgery, reproduction, nutrition, and herd health*. 1^a ed. Canada: Elsevier p 286 - 296.
230. **Timmis K, Boulnois G, Bitter-Suermann D y Cabello F. 1985.** Surface components of *Escherichia coli* that mediate resistance to the bactericidal activities of serum and phagocytes. *Curr Top Microbiol Immunol* 118: 197 - 218.
231. **Touchon M, Hoede C, Tenaillon O, Barbe V, Baeriswyl S, Bidet P, Bingen E, Bonacorsi S, Bouchier C, Bouvet O, Calteau A, Chiapello H, Clermont O,**

- Cruveiller S, Danchin A, Diard M, Dossat C, Karoui M, Frapy E, Garry L, Ghigo J, Gilles A, Johnson J, Le Bouguénec C, Lescat M, Mangenot S, Martinez-Jéhanne V, Matic I, Nassif X, Oztas S, Agnés M, Pichon C, Rouy Z, Ruf C, Schneider D, Tourret J, Vacherie B, Vallenet D, Médigue C, Rocha E y Denamur E. 2009.** Organised genome dynamics in the *Escherichia coli* species results in highly diverse adaptive paths. PLoS Genet 5: e1000344.
232. **Unhanand M, Musatafa M, McCracken G y Nelson J. 1993.** Gram-negative enteric bacillary meningitis: a twenty-one year experience. J Pediatr 122: 15 - 21.
233. **Valens M, Penaud S, Rossignol M, Cornet F y Boccard F. 2004.** Macrodomain organization of the *Escherichia coli* chromosome. EMBO J; 23:4330 - 4341.
234. **Van Belkum A, Struelens M, de Visser A, Verbrugh H y Tibayrenc M. 2001.** Role of genomic typing in taxonomy, evolutionary genetics, and microbial epidemiology. Clin Microbiol Rev 14(3): 547 - 560.
235. **Van Elsas J, Semenov A, Costa R y Trevors J. 2011.** Survival of *Escherichia coli* in the environment: fundamental and public health aspects. The ISME Journal 5: 173 - 183.
236. **Varela G, Gomez-Duarte O y Ochoa T. 2010.** Diarrheagenic *Escherichia coli* in Children from Uruguay, Colombia and Peru. En: Torres A, ed. Pathogenic *Escherichia coli* in Latin America. 1ª ed. USA: Bentham p 209 - 222.
237. **Vidal M, Kruger E, Durán C, Lagos R, Levine M, Prado V, Toro C y Vidal R. 2005.** Single multiplex PCR assay to identify simultaneously the six categories of diarrheagenic *Escherichia coli* associated with enteric infections. J. Clin. Microbiol. 43, 5362 - 5365.
238. **Vieira M, Andrade J, Trabulsi L, Rosa A, Dias A, Ramos S, Frankel G y Gomes T. 2001.** Phenotypic and genotypic characteristics of *Escherichia coli* strains of non-enteropathogenic *E. coli* (EPEC) serogroups that carry *eae* and lack the EPEC adherence factor and Shiga toxin DNA probe sequences. J Infect Dis 183: 762 - 772.
239. **Waite L, Cebra C, Firshman A, McKenzie E, Schlipf J. 2008.** Cryptosporidiosis in 20 alpaca crias. J Am Vet Med Assoc. 233: 294 - 298.
240. **Walk S, Alm E, Calhoun L, Mladonicky J y Whittam T. 2007.** Genetic diversity and population structure of *Escherichia coli* isolated from freshwater beaches. Environ microbiol 9(9): 2274 - 2288.
241. **Watanabe T. 1963.** Infective heredity of multiple drug resistance in bacteria. Bacteriol rev 27: 87–115.

242. **Weissman S, Chattopadhyay S, Aprikian P, Obata-Yasuoka M, Yarova-Yarovaya Y, Stapleton A, Ba-Thein W, Dykhuizen D, Johnson J y Sokurenko E. 2006.** Clonal analysis reveals high rate of structural mutations in fimbrial adhesins of extraintestinal pathogenic *Escherichia coli*. *Mol Microbiol* 59(3): 975 - 988.
243. **Wernery U. 2001.** Camelid immunoglobulins and their importance for the new-born – a review. *J Vet Med B* 48: 561 - 568.
244. **Whitehead C, Anderson D. 2006.** Neonatal diarrhea in llamas and alpacas. *Small Ruminant Res* 61: 207 - 215.
245. **Whitehead C, Cebra C. 2010.** En: Cebra C, Anderson D, Tibary A, Van Saun R, Johnson L, eds. *Llama and alpaca care : medicine, surgery, reproduction, nutrition, and herd health*. 1ª ed. Canada: Elsevier p 552 - 575.
246. **Whittam T, Ochman H, Selander R. 1983.** Multilocus genetic structure in natural populations of *Escherichia coli*. *Proc Natl Acad Sci U.S.A.* 80(6): 1751 - 1755.
247. **Williams K, Kelly D. 2013.** Proposal for a new Class within the *Proteobacteria*, the *Acidithiobacillia*, with the *Acidithiobacillales* as the type Order. *International Journal Systematic and Evolutionary Microbiology* 63: 3547 - 3548.
248. **Williams K, Gillespie J, Sobral B, Nordberg E, Snyder E, Shallom J y Dickerman A. 2010.** Phylogeny of Gammaproteobacteria. *Journal of bacteriology*. 192 (9): 2305–2314
249. **Wirth T, Falush D, Lan R, Colles F, Mensa P, Wieler L, Karch H, Reeves P, Maiden M, Ochman H y Achtman M. 2006.** Sex and virulence in *Escherichia coli*: an evolutionary perspective. *Mol microbiol* 60(5): 1136 - 1151.
250. **Woese C, Kandler O, Wheelis M. 1990.** Towards a natural system of organisms: Proposal for the domains Archaea, Bacteria, and Eucarya. *Proc Natl Acad Sci* 87: 4576 – 4579
251. **Wu C, Hsueh P, Ko W. 2011.** A new health threat in Europe: Shiga toxin-producing *Escherichia coli* O104:H4 infections. *J Microbiol Immunol Infect* 44(5): 390 - 393.
252. **Wyckoff E, Duncan D, Torres A, Mills M, Maase K y Payne S. 1998.** Structure of the *Shigella dysenteriae* haem transport locus and its phylogenetic distribution in enteric bacteria. *Mol Microbiol* 28: 1139 - 1152.
253. **Yaron S, Kolling G, Simon, L y Matthews K. 2000.** Vesicle-mediated transfer of virulence genes from *Escherichia coli* O157:H7 to other enteric bacteria. *Appl Environ Microbiol* 66(10): 4414 - 4420.
254. **Yoon W, Hovde C. 2008.** All blood, no stool: enterohemorrhagic *Escherichia coli*

- O157:H7 infection. J Vet Sci. 9: 219–231.
255. **Zadik P, Chapman P, Siddons C. 1993.** Use of tellurite for the selection of verocytotoxigenic *Escherichia coli* O157. J Med Microbiol 39(2): 155 - 158.
256. **Zhang L, Foxman B, Marrs C. 2002.** Both urinary and rectal *Escherichia coli* isolates are dominated by strains of phylogenetic group B2. J Clin Microbiol 40: 3951 - 3955.
257. **Zhou Z, Li X, Liu B, Beutin L, Xu J, Ren Y, Feng L, Lan R, Reeves P y Wang L. 2010.** Derivation of *Escherichia coli* O157:H7 from its O55:H7 precursor. PLoS One 5(1): 8700.